สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นพญาวานร ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง

ชัยยา พูนทรัพย์สถิต

วราภรณ์ เจนธนอรรถกิจ

วพ.
ช4197
2550

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 83998
วัน,เดือน,ปี 23 ก.ย. 2551

b 11972886
i.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาโครงงานพิเศษ หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cytotoxicity of *Pseuderatherum platiferum* on cell line *in vitro*

Chaiya Phoonsupsathit

Waraporn Janethana-arthakit

A Report Submitted in Partial Special Project of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Biotechnology Program

Department of Applied Biology, Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง	**การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง**	
นักศึกษา	**นายชัยยา พูนทรัพย์สถิต**	**รหัส 47050119**
	นางสาววราภรณ์ เจนธนอรรถกิจ	**รหัส 47050157**
สาขาวิชา	**เทคโนโลยีชีวภาพ**	
ภาควิชา	**ชีววิทยาประยุกต์**	
อาจารย์ที่ปรึกษา	**ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม**	

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้ทำโครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร-บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง
นักศึกษา	ชัยยา พูนทรัพย์สถิต วราภรณ์ เจนธนอรรถกิจ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	พ.ศ. 2550
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

พญาวานร (*Pseuderatherum platiferum*) เป็นพืชสมุนไพรพื้นเมืองของประเทศเวียดนาม มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ภูมิแพ้ เป็นต้น โดยจุดประสงค์ในการทดลองนี้เพื่อศึกษาการสกัดสารอย่างหยาบจากพญาวานร (โดยใช้เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลในการสกัด) และเพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลองในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งในการศึกษานี้ทำการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยใช้เซลล์ไลน์ L929 และ P388 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM และ RPMI ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ fetal bovine serum (FBS) ตามลำดับ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบด้วยสารสกัดอย่างหยาบจากพญาวานรที่ความเข้มข้น 0 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัม-ต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าค่า CC_{50} ของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ทดสอบกับเซลล์ไลน์ L929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.33 1.95 และ 2.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1.56 1.59 และ 1.81 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนค่า CC_{50} ของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ทดสอบกับเซลล์ไลน์ P388 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.31 3.02 และ 3.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 2.17 2.60 และ 2.64 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Cytotoxicity of *Pseuderatherum platiferum* on cell line *in vitro*
Name	Chaiya Phoonsupsathit
	Waraporn Janethana-arthakit
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2550
Special Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Supattar Poeaim

Abstract

Paya Vanone (*Pseuderatherum platiferum*) is a Vietnamese medical plant that has a wide range of ability to cure diseases such as diabetes, high blood pressure, hemorrhoids and allergies. This experiment is established in order to observe crude extract of Paya Vanone (using hexane, dichloromethane and ethanol) and to study the toxicity to murine cells at different concentrations. This *in vitro* experiment uses L929 and P388 cell lines cultivated in DMEM and RPMI, both containing with 10% of fetal bovine serum (FBS) for 24 hours. Afterwards, the cells were tested with crude extract from Paya Vanone at the concentrations of 0, 0.375, 0.75, 1.5 and 3 mg/ml for 24 and 48 hours, and then tested its toxicity to the cells using MTT assay to conclude the viability rate of the cells. The CC_{50} from hexane, dichloromethane and ethanol extract of L929 is 2.33, 1.95 and 2.77 mg/ml, respectively after treatment 24 hours and 1.56, 1.59 and 1.81 mg/ml, respectively after treatment 48 hours. In P388, the CC_{50} is 2.31, 3.02 and 3.49 mg/ml, respectively after treatment 24 hours and 2.17, 2.60 and 2.64 mg/ml, respectively after treatment 48 hours.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ รวมทั้งได้กรุณาตรวจแก้ไขด้านภาษาและแนะนำในด้านต่าง ๆ ในการทำโครงงานพิเศษนี้เป็นอย่างดี และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ ผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำที่ดีมาโดยตลอด รวมทั้งตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัต ทองจันทร์ และคุณพงศ์ศักดิ์ ประสานภักดี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนเพื่อน พี่ และน้อง ๆ ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ชัยยา พูนทรัพย์สถิต
วราภรณ์ เจนธนอรรถกิจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	4
2.1 พญาวานร	4
2.1.1 คุณลักษณะทางพฤกษศาสตร์และวิทยาศาสตร์	4
2.1.2 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา	4
2.1.3 การทดลองของพืชชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพญาวานร	5
2.2 เซลล์ไลน์ mouse connective tissue fibroblast (L929)	7
2.3 เซลล์ไลน์ murine lymphocytic leukemia (P388)	8
2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์	9
2.4.1 ชนิดของเซลล์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์	9
2.4.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์	10
2.4.3 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์เพาะเลี้ยง	11
2.5 อาหารเลี้ยงเซลล์	12
2.5.1 อาหารพื้นฐาน	12
2.5.2 ซีรัม	13
2.6 เทคนิคพื้นฐานสำหรับการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยง	14
2.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6.2 การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง	15
2.6.3 การเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง	17
2.6.4 การเก็บรักษาเซลล์และการนำเซลล์กลับมาเลี้ยงใหม่	22
2.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	24
2.7.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์	24
2.8 สารสำคัญในพืชสมุนไพร	29
2.8.1 คาร์โบไฮเดรต	29
2.8.2 ไขมัน	29
2.8.3 น้ำมันหอมระเหย	29
2.8.4 เรซิน และบาลซัม	30
2.8.5 แอลคาลอยด์	30
2.8.6 ไกลโคไซด์	30
2.8.7 แทนนิน	30
2.8.8 เทอร์พีนอยด์	30
2.9 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร	31
2.9.1 น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย	31
2.9.2 วิธีการสกัด	32
2.9.3 การเลือกวิธีการสกัด	35
2.9.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น	35
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	37
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	37
3.1.1 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง	37
3.1.2 วัสดุอุปกรณ์	37
3.1.3 สารเคมี	38
3.2 การเตรียมสารสกัดจากพญาวานร	38
3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929	39
3.3.1 การ subculture เซลล์ไลน์ L929	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3.2 การทำ cryopreservation เซลล์ไลน์ L929	40
3.3.3 การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929	40
3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388	40
3.4.1 การ subculture เซลล์ไลน์	40
3.4.2 การทำ cryopreservation เซลล์ไลน์ P388	41
3.4.3 การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ P388	41
3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพญาวานร	42
3.5.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ L929 ด้วยวิธี MTT	42
3.5.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ P388 ด้วยวิธี MTT	44
3.6 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	45
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	46
4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929	46
4.1.1 การ subculture	46
4.1.2 การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929	47
4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388	49
4.2.1 การ subculture	49
4.2.2 การศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ P388	50
4.3 การสกัดสารจากพญาวานร	52
4.4 การทดสอบความเป็นพิษของพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ ด้วยวิธี MTT	55
4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ด้วยวิธี MTT	55
4.4.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ P388 ด้วยวิธี MTT	60
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	68
เอกสารอ้างอิง	70

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ข้อดี และ ข้อเสียของการ subculture	17
4.1 จำนวนเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 14 วัน	47
4.2 จำนวนเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 7 วัน	50
4.3 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากพญาวานร	53
4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	57
4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	57
4.6 การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ที่ร้อยละ 50 (CC_{50}) เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 100 ซึ่งได้จากการคำนวณ	60
4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง	62
4.8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	62
4.9 การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ P388 ที่ร้อยละ 50 (CC_{50}) เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 100 ซึ่งได้จากการคำนวณ	65
ข-1 การทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ในเซลล์ไลน์ L929 ที่ 24 ชั่วโมง	77
ข-2 การทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ในเซลล์ไลน์ L929 ที่ 48 ชั่วโมง	78
ข-3 การทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ในเซลล์ไลน์ P388 ที่ 24 ชั่วโมง	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-4 การทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ในเซลล์ไลน์ P388 ที่ 48 ชั่วโมง	79
ค-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	80
ค-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	80
ค-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	81
ค-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต เมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะใบของพญาวานร	5
2.2 ลักษณะของต้นพญาวานร	5
2.3 เซลล์ไลน์ L929 ที่กำลังขยาย 200 เท่า	8
2.4 เซลล์ไลน์ P388 ที่กำลังขยาย 100 เท่า	8
2.5 อาหาร DMEM	13
2.6 การเจริญของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นเซลล์ปกติ	17
2.7 Haemacytometer	20
2.8 Homogenizer	33
2.9 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีเพอร์โคเลชัน	34
2.10 การสกัดสารจากพืชแบบต่อเนื่องโดยวิธีการสกัดด้วย soxhlet extractor	34
2.11 โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator)	36
3.1 แผนผังการทดลองการใส่สารสกัดจากพญาวานร ใน 96-well plate	43
4.1 ลักษณะของเซลล์ไลน์ L929 ที่เกาะพื้นผิวแล้ว ที่กำลังขยาย 100 เท่า	46
4.2 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ที่ passage 98 เป็นระยะเวลา 14 วัน	48
4.3 ลักษณะของเซลล์ไลน์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย ที่กำลังขยาย 200 เท่า	49
4.4 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ P388 เป็นระยะเวลา 7 วัน	51
4.5 ภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดจากพญาวานร	53
4.6 แสดงตัวอย่างสารสกัดหยาบจากพญาวานรที่ได้จากเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล	54
4.7 แสดงตัวอย่างความเข้มข้นระดับต่างๆของสารสกัดจากพญาวานร	54
4.8 เซลล์ L929 ที่ได้รับการทดสอบด้วยวิธี MTT	56
4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต ที่ 24 ชั่วโมง	58
4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต ที่ 48 ชั่วโมง	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 เซลล์ P388 ที่ได้รับการทดสอบด้วยวิธี MTT	61
4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ที่ 24 ชั่วโมง	63
4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ที่ 48 ชั่วโมง	64
ก-1 บริเวณที่ใส่เซลล์ลงไปใน hemacytometer	74
ก-2 การนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer แบบ 5 ช่องใหญ่	75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

เนื่องจากปัจจุบันคนไทยนิยมใช้พืชสมุนไพรในการรับประทานและรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆแทนสารเคมี โดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำสารสกัดจากสมุนไพรมารักษาโรคต่างๆเช่น เบาหวาน ความดันโลหิตสูง ริดสีดวง ภูมิแพ้ เป็นต้น สมุนไพรที่นำมาทำเป็นยารักษาโรคมีมากมายหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ทองพันชั่ง ฟ้าทะลายโจร และพญายอ ซึ่งสมุนไพรที่กล่าวมาเป็นสมุนไพรที่อยู่ในวงศ์ Acanthaceae และยังมีสมุนไพรในวงศ์เดียวกันอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจและยังไม่มีการศึกษาถึงสรรพคุณที่แน่นอน นั่นคือ ต้นพญาวานร

พญาวานรมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pseuderatherum platiferum* อยู่ในวงศ์ Acanthaceae เป็นพืชพื้นเมืองของประเทศเวียดนาม เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าฮว่านง็อก (Hoan Ngoc) มีลักษณะทั่ว ๆ ไป คือ เป็นต้นไม้ชนิดใบอ่อน ปลายแหลม เป็นใบเดี่ยวออกเรียงตรงกันข้ามตามต้นและกิ่งรูปทรงรี กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ส่วนล่างของใบจะหยาบสีเขียวเข้ม ด้านบนสีเขียวอ่อน จะมีใบมาก แตกกิ่งก้านทรงพุ่ม ลำต้นตรง เปลือกต้นเรียบสีเขียว สูงราว1-2 เมตร การขยายพันธุ์เพียงตัดยอดปักชำลงในดินก็เกิดรากตั้งตัวได้เร็ว ย้ายลงปลูกในกระถาง ชอบที่ร่มไม่ชอบแดด

การใช้ประโยชน์ได้ทั้งการใช้ใบสดเคี้ยวกินหรือคั้นกรองเอาน้ำโดยมีสรรพคุณเป็นยารักษาอาการต่างๆได้มากมาย ได้แก่ ไข้หวัด เคล็ดขัดยอก เลือดออกในลำไส้ คอพอก ตับอักเสบ โรคกระเพาะอาหาร โรคมะเร็งปอด อาการมดลูกหย่อนของหญิงคลอดบุตรใหม่ และความดันโลหิตสูง เป็นต้น (http://roiet.doae.go.th/mueang)

ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้พืชสมุนไพรในการรับประทานและรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง และในพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพญาวานรนี้ ได้มีผู้นำมารักษาโรคต่างๆ เช่น

1. ทองพันชั่ง *(Rhinacanthus nasutus* Linn.) มีสรรพคุณใช้รักษา แก้ไขข้ออักเสบ เบาหวาน มะเร็ง
2. พญายอ (*Clinacanthus nutans* Burm.f.) มีสรรพคุณใช้รักษา อาการอักเสบเฉพาะที่ ถอนพิษแมลงสัตว์กัดต่อย
3. ฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Burm.f.) มีสรรพคุณใช้รักษา ลดไข้ ลดการอักเสบ เจ็บคอ

(http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการศึกษาสมุนไพรหรือสารสกัดจากพืชนั้นจะทำการศึกษาว่าสมุนไพรชนิดนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ โดยในปัจจุบันจะมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง (*In Vivo*) เช่น หนูกระต่าย เป็นต้นและในหลอดทดลอง (*In Vitro*) เช่น เซลล์ตับ เซลล์ผิวหนัง และเซลล์มะเร็ง เป็นต้น วิธีในการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Lactate dehydrogenase (LDH), Neutral red assay, Trypan blue และ MTT Test (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) เป็นต้น โดยในการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ ด้วยวิธี MTT Test เป็นวิธีที่ง่าย และเป็นการทดสอบความเป็นพิษของสารในเซลล์ที่ยังมีชีวิต ดังนั้นในการตรวจสอบความเป็นพิษจากสารสกัดจากต้นพญาวานร ที่มีผลต่อเซลล์หนูในหลอดทดลองจึงเลือกทำการทดสอบด้วยวิธี MTT

ในปัจจุบันสารสกัดจากต้นพญาวานรยังไม่มีมีงานวิจัยที่เพียงพอต่อการยอมรับของผู้บริโภคว่ามีผลข้างเคียงต่อร่างกายหรือไม่ และยังไม่ทราบชนิดของสารสำคัญที่มีฤทธิ์ในการรักษาโรค ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากต้นพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลองโดยทำการทดสอบด้วยวิธี MTT เพื่อเป็นการทดสอบในเบื้องต้นก่อนที่จะนำสารสกัดจากต้นพญาวานรไปพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคในอนาคตต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อทำการสกัดสารจากต้นพญาวานร ด้วยวิธีการสกัดแบบหมักในตัวทำละลาย 3 ชนิด ได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล
2. ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากต้นพญาวานร ที่มีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ L929 และ P388ในหลอดทดลอง
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดจากต้นพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในสารละลาย เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลในหลอดทดลอง ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน
2. ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทำให้ทราบถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากต้นพญาวานร ที่สามารถใช้เป็นยารักษาโรคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดจากต้นพญาวานรเพื่อใช้รักษาโรคต่อไป
3. เพื่อให้สารสกัดจากต้นพญาวานรเป็นที่ยอมรับในผู้บริโภคมากขึ้น
4. ได้เรียนรู้ และฝึกฝนการทำงานทางด้านการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 พญาวานร

พญาวานร หรือฮว่านง็อก เป็นต้นสมุนไพรที่ถือกำเนิดในประเทศเวียดนาม มีสรรพคุณแก้โรคต่าง ๆ มากมาย เช่น รักษาอาการปวด ต้านการอักเสบ ลดความดัน โรคเบาหวาน อาการท้องเดินและเจ็บคอ เป็นต้น

2.1.1 คุณลักษณะทางพฤกษศาสตร์และวิทยาศาสตร์

ชื่อสมุนไพร	พญาวานร
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Pseuderatherum platiferum*
ชื่อสามัญ	ฮว่านง็อก, ว่านลิง
ชื่อวงศ์	Acanthaceae

เป็นต้นไม้ชนิดใบอ่อน ปลายแหลม เป็นใบเดี่ยวออกเรียงตรงกันข้ามตามต้นดังรูปที่ 2.1 และกิ่งรูปทรงรี กว้าง 3-5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร ส่วนล่างของใบจะหยาบสีเขียวเข้ม ด้านบนสีเขียวอ่อน จะมีใบมาก แตกกิ่งก้านทรงพุ่ม ลำต้นตรง เปลือกต้นเรียบสีเขียว สูงราว 1-2 เมตร ดังรูปที่ 2.2 การขยายพันธุ์เพียงตัดยอดปักชำลงดินจะเกิดรากตั้งตัวได้เร็ว ย้ายลงปลูกในกระถาง ชอบที่ร่มไม่ชอบแสงแดด (http://hoanngoc.th.com)

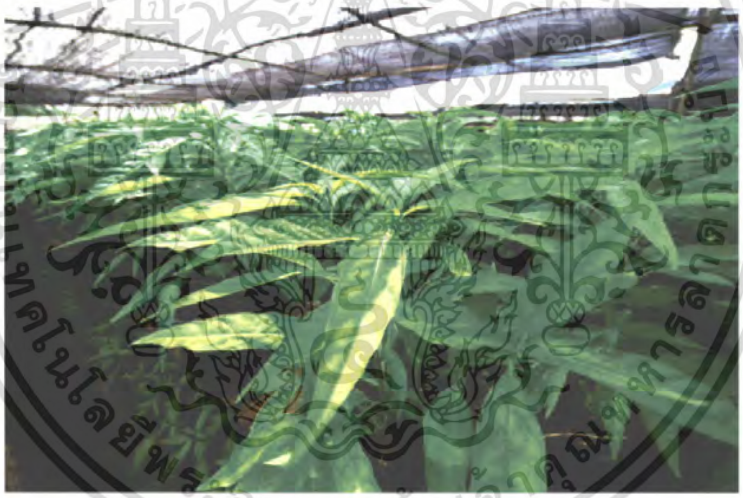
2.1.2 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา

การใช้ประโยชน์ได้ทั้งการใช้ใบสดเคี้ยวกินหรือคั้นกรองเอาน้ำโดยมีสรรพคุณคือ เป็นยารักษาอาการต่างๆ ได้แก่ (http://roiet.doae.go.th/mueang)

1. รักษาไข้หวัด
2. รักษาบาดแผล เคล็ดขัดยอก อาการปวดต่างๆที่ไม่ทราบสาเหตุ กระดูกหัก
3. รักษาอาการ โรคเลือดออกในลำไส้
4. รักษาอาการคอพอก ตับอักเสบ อาการไตอักเสบ
5. รักษาโรคกระเพาะอาหาร กระเพาะปัสสาวะอักเสบ ปัสสาวะเป็นเลือด
6. รักษาอาการโรคมะเร็งปอด
7. รักษาโรคตาทุกชนิด เช่น ตาแดง ตาต้อ ตาห้อเลือด
8. รักษาอาการมดลูกหย่อนของหญิงคลอดบุตรใหม่ เพื่อช่วยให้มดลูกเข้าอู่
9. รักษาโรคความดันโลหิตสูง ความดันโลหิตต่ำ โรคประสาทอ่อนๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 ลักษณะใบของพญาวานร (http://hoanngoc.th.com)



รูปที่ 2.2 ลักษณะของต้นพญาวานร (http://hoanngoc.th.com)

2.1.3 การทดลองของพืชชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพญาวานร

ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้พืชสมุนไพรในการรับประทานและรักษาโรคต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง และในพืชที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพญาวานรนี้ ได้มีผู้นำมารักษาโรคต่างๆ เช่น ทองพันชั่ง พญายอ และฟ้าทะลายโจร เป็นต้น

Kintanar และ Mercado-Sison (1978) รายงานว่าการฉีดสารสกัดซาโปนินของฟ้าทะลายโจรเข้าช่องท้องของหนูถีบจักรในขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้สัตว์ทดลองเพลีย หายใจเร็ว กล้ามเนื้ออ่อนแรง และมีการเปลี่ยนอิริยาบถลดลง ในขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากฉีดได้ 8 นาที มีอาการชัก สั่นและตาย ส่วนสารสกัดน้ำของฟ้าทะลายโจรในขนาด 300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิลลิกรัม ทำให้สัตว์ทดลองเพลียมีอาการอ่อนเพลีย การหายใจเร็ว การรับรู้ลดลงและกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการคงอยู่ 24 ชั่วโมง ในขนาด 1,000 มิลลิกรัม มีอาการคล้ายๆ กับขนาด 300 มิลลิกรัม แต่ตายใน 24 ชั่วโมง สารสกัดอีเทอร์ของฟ้าทะลายโจร 100 มิลลิกรัม ทำให้การรับรู้ และระบบการเคลื่อนไหวลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาการคงอยู่ 1 ชั่วโมง ส่วนในขนาด 1,000 มิลลิกรัม อาการเหมือนกันแต่ตายใน 45 นาที สารสกัดอีเทอร์จากฟ้าทะลายโจรในขนาด 300 มิลลิกรัม ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย การเคลื่อนไหวและกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการจะคงอยู่ 2 ชั่วโมงเมื่อให้ขนาด 1,000 มิลลิกรัม อาการอ่อนแรงและตายหลัง 24 ชั่วโมง สารสกัดแอลกอฮอล์ของฟ้าทะลายโจรขนาด 300 มิลลิกรัม ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย การเคลื่อนไหวลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาการคงอยู่ 24 ชั่วโมง ขนาด 1,000 มิลลิกรัม ในเวลา 5 ชั่วโมง 5 นาทีหลังฉีด หนูจะมีอาการสั่นในที่สุดตาย ส่วนสารสกัดอีเทอร์ของฟ้าทะลายโจรที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่วนหนึ่งในขนาด 1000 มิลลิกรัม จะทำให้อ่อนเพลีย และตายใน 3 ชั่วโมง 30 นาทีหลังได้ยา

Wu และคณะ (1988) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งของ rhinacanthin-A และ B ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบในต้นทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Linn.)โดยทดสอบกับเซลล์มะเร็งช่องปาก (KB Cell) พบว่า rhinacanthin-B มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งช่องปาก โดยมีค่า ED_{50} เท่ากับ 3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ rhinacanthin-A ไม่มีฤทธิ์ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งของสารในกลุ่ม naphthoquinone และ flavonoid โดยใช้เซลล์มะเร็งชนิด KB, P-388, A-549, HT-29 และ HL-60 พบว่าสาร naphthoquinone ทุกชนิดที่ใช้ในการทดลอง มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งชนิด KB, P-388, A-549, HT-29, และ HL-60 (Wu และคณะ, 1988b)

Siripong และคณะ (1992) ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบของต้นฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Burm.f.) ที่ความเข้มข้น 5.3 และ 3.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ human epidermoid carcinoma ของช่องจมูก และ P388 lymphocytic leukemia cells ในหลอดทดลอง ตามลำดับ โดยมีสาร andrographolide เป็นสารออกฤทธิ์ในขนาด 1.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนสาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ neoandrographolide ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว

Otake และคณะ (1995) ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบของต้นฟ้าทะลายโจร พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MT-4 ความเข้มข้นของสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ 100 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า 35 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดน้ำจากใบความเข้มข้น 220 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ผลไม่ชัดเจนในการแสดงฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง MT-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Siripong และคณะ (1997) ได้ทำการการทดลองทดสอบสารสกัดของทองพันชั่งกับเซลล์ P388 lymphocytic leukemia ซึ่งเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูโดยใช้สารสกัดเฮกเซนจากราก ทองพันชั่ง พบว่าสารที่ก่อความเป็นพิษเป็นอนุพันธ์ของ naphthoquinone มี 3 ชนิด คือ epoxyrhinacanthin B, epoxy- rhinacanthin C, rhinacanthin C โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.62, 1.42 และ 3.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

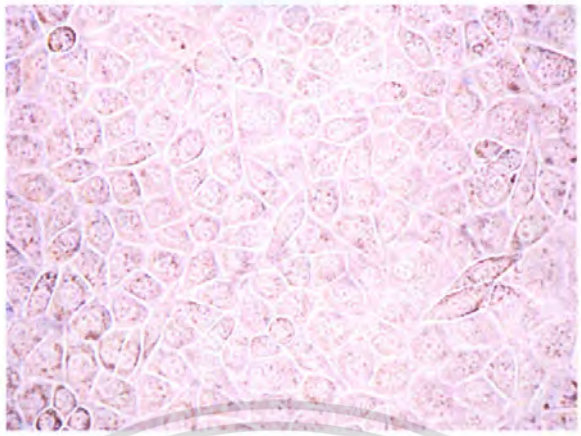
มีการทดสอบความเป็นพิษของฟ้าทะลายโจร โดยนำสารสกัดมาตรฐาน (สกัดด้วยอัล-กอฮอล์ 70%) มาให้หนูขาวกินในขนาด 20, 200 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 60 วัน ไม่พบพิษต่ออวัยวะสืบพันธุ์ (Burgos และคณะ, 1997) แต่มีรายงานว่าเมื่อให้อาหารที่ผสมลำต้นใน สัดส่วน 40 มิลลิกรัม ต่อหนูถีบจักรสายพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมียแต่ละตัว นาน 14 วัน แล้ว จึงให้ผสมพันธุ์ และยังคงให้อาหารที่ผสมฟ้าทะลายโจรต่ออีก 3 สัปดาห์ พบว่าหนูเพศเมียเป็นหมัน (Shamsuzzoha และคณะ, 1978) เมื่อให้อาหารที่มีส่วนผสมของราก ลำต้น และใบฟ้าทะลายโจร 0.75 เปอร์เซ็นต์แก่หนูถีบจักรสายพันธุ์ Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่าอาหารที่มีส่วนผสมของ ลำต้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อหนูกินนาน 3 สัปดาห์ขึ้นไปเท่านั้นที่มีผลลดการมีลูกของหนูเพศผู้ (Shamsuzzoha และคณะ, 1979)

2.2 เซลล์ไลน์ mouse connective tissue fibroblast (L929)

(http://www.dsmz.de/mutz/mutz002.htm)

เซลล์ไลน์ L929 เป็นเซลล์ไลน์เนื้อเยื่อเส้นใยของหนูที่เจริญแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ในการเพาะเลี้ยงจะใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาประมาณ 3 – 4 วัน เซลล์จึงจะเจริญเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงทำการ subculture โดยใช้เอนไซม์ ทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ การเก็บเซลล์แช่แข็งจะเก็บในอาหาร เพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM หรือ RPMI 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ภาพเซลล์ไลน์ L929 แสดงดังรูปที่ 2.3

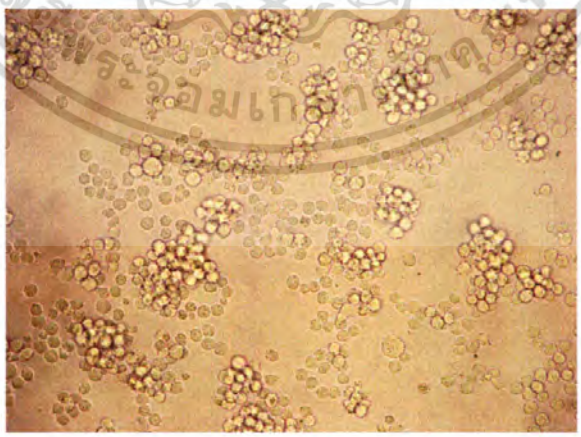
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 เซลล์ไลน์ L929 ที่กำลังขยาย 200 เท่า

2.3 เซลล์ไลน์ murine lymphocytic leukemia (P388)

เซลล์ไลน์ P388 เป็นเซลล์ไลน์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู มีการเจริญแบบแขวนลอย ในการเพาะเลี้ยงจะใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาประมาณ 3 วัน เซลล์จึงจะเจริญเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงทำการ subculture แล้วบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ การเก็บเซลล์แช่แข็งจะเก็บในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ภาพเซลล์ไลน์ P388 แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 เซลล์ไลน์ P388 ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ กัลยาณี (2550)

เซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์ เป็นเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อของสัตว์หรือจากเซลล์ไลน์ที่นำมาเพาะเลี้ยงในสภาวะนอกร่างกายให้เกิดการเจริญเพิ่มจำนวนในภาชนะเลี้ยงที่เป็นแก้ว หรือพลาสติก ซึ่งบรรจุอาหารที่กระตุ้นให้เซลล์อยู่รอดเจริญเพิ่มจำนวน เซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้อาจให้กลุ่มเซลล์ที่มีลักษณะพันธุกรรมเหมือนกัน (homogenous population) หรือแตกต่างกัน (heterogeneous population) การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์แต่เดิมแบ่งเป็น organ culture, explant culture และ cell culture ซึ่ง cell culture จะเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ที่นิยมที่สุด โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ เนื่องจากเซลล์มีคุณสมบัติที่สม่ำเสมอ และสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ให้เกิดความสำเร็จดีต้องอาศัยเทคนิคต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความมีชีวิตของเซลล์ให้เซลล์ปลอดการปนเปื้อน ขณะที่ให้สภาพแวดล้อมและสารอาหารเหมาะสมต่อการเจริญการพัฒนาของเซลล์ได้อย่างต่อเนื่อง เป็นหลาย ๆ รุ่นของการถ่ายเลี้ยง ซึ่งมีผลให้สามารถใช้เซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์เป็นเครื่องมือไปประยุกต์กับเทคโนโลยีเซลล์สัตว์อีกมากมายทั้งทางชีววิทยา และอณูชีววิทยา ด้วยการให้เซลล์เป็นแหล่งผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพที่มีประโยชน์ หรืออาจเป็นเครื่องมือในการค้นพบและทดสอบทางการแพทย์ กสิกรรม และสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์จึงเป็นส่วนหนึ่งของเทคโนโลยีชีวภาพที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย เพื่อให้เกิดประโยชน์ต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ต่อไป

2.4.1 ชนิดของเซลล์ที่พบในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เซลล์สัตว์มักถูกกำหนดด้วยแหล่งของเนื้อเยื่อที่นำเซลล์มา ซึ่งจะให้เซลล์มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเซลล์ที่มักพบในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีอยู่ 5 ชนิด คือ fibroblast, epithelial cells, muscle cells, lymphocytes และ เซลล์ประสาท

2.4.1.1 Fibroblast – like (Fibroblastoid)

เซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือเนื้อเยื่อที่เป็นโครงสร้างของร่างกาย เช่น เอ็น-กล้ามเนื้อ จะเป็นไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) ซึ่งจะจับกับโปรตีนคอลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ชนิดนี้เมื่อเริ่มแยกออกจากเนื้อเยื่อด้วยทริปซิน จะมีรูปร่างกลม แต่เมื่อเกาะกับพื้นแข็งจะมีลักษณะบางยาวคล้ายกระสวย และเซลล์ด้านบน ด้านล่างจะมีลักษณะเหมือน ๆ กัน เซลล์จะเจริญเพิ่มจำนวนได้ดี และสามารถเลี้ยงให้เป็นเซลล์ไลน์ได้ง่าย

2.4.1.2 Epithelial – like (Epitheloid)

เซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อบุผิวซึ่งหุ้มท่อหรืออวัยวะ เซลล์ประเภทนี้เมื่อเกาะบนพื้นผิวจะมีลักษณะเป็นเหลี่ยม ๆ คล้ายกระเบื้องปูพื้น เซลล์จะมีการเกาะเรียงตัวชิดกันมาก ซึ่งเรียกว่า tight junctions การแยกเซลล์ออกจากกันอาจทำลายเซลล์ได้ โดยการต่อชิดกันของเซลล์จะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

desmosomes ซึ่งเชื่อมต่อเซลล์หนึ่งกับอีกเซลล์หนึ่ง และ desmosomes จะเป็นช่องผ่านระหว่างเซลล์ที่ติดกัน ทำให้มีการแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างเซลล์ได้ เซลล์ประเภทนี้จะมีลักษณะด้านบนและด้านล่างของเซลล์ต่างกัน และมักเป็นเซลล์ที่หลั่งสารที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น เซลล์ที่สร้างฮอร์โมน เป็นต้น ทั้งเซลล์ fibroblast และ epithelial cells มักมีอัตราการเจริญ หรือ doubling time อยู่ในช่วงเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2.4.1.3 Muscle cells

เป็นเซลล์มาจากเนื่อเยื่อกล้ามเนื้อ ซึ่งเซลล์ที่อยู่ระหว่างการพัฒนาไปเป็นเซลล์เต็มวัยที่มีคุณสมบัติ differentiation หรือเป็น precursor cells จะมีลักษณะเป็นทรงกระบอกที่เซลล์อาจหลอมรวมเป็น multinucleate complex ซึ่งจะมีโปรตีนโครงสร้างของ actin และ myosin อยู่ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะเป็นลายตามขวางชัดเจน ซึ่งเกิดจากการเรียงตัวของไมโอ-ไฟบริล (myofibril)

2.4.1.4 Nerve cells

เป็นเซลล์ที่มาจากเนื้อเยื่อประสาทที่มีรูปร่างคล้ายดาว มีตัวเซลล์ (cell body) และแขนงของเซลล์ ได้แก่ เดนไดรต์ (dendrite) และแอกซอน (axon) เช่น glia cells โดยปกติเซลล์ประสาทมีการพัฒนามามาก จึงไม่สามารถแบ่งตัวในการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้ แต่การเสริม nerve growth factor อาจทำให้ส่วนของ cytoplasmic แผ่ออก หรืออาจสังเกตเห็นการเจริญของ neuroblastomas ได้

2.4.1.5 Suspension cells

เป็นเซลล์ที่มากจากเนื้อเยื่อเลือด ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือด เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocyte) เป็นเซลล์ที่ไม่ต้องการเกาะกับพื้นผิว มักเป็นเซลล์ที่อยู่ในระบบเลือด หรือเซลล์มะเร็ง เซลล์ประเภทนี้จึงสามารถเคลื่อนตัวได้อย่างอิสระในอาหาร อาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว (single) หรือกลุ่มเซลล์ได้

2.4.2 ประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เทคโนโลยีการเลี้ยงสัตว์ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กันมาก ในงานทางด้านชีววิทยา ทางการแพทย์ และอณูชีววิทยา (molecular biology) โดยโปลิโอไวรัส (poliomyelitis virus) และวัคซีนเป็นผลิตภัณฑ์แรกที่มาจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ซึ่งเซลล์เพาะเลี้ยงช่วงแรกๆจะเป็นเซลล์ปฐมภูมิของ human embryonic cells ที่ให้อนุภาคไวรัส ซึ่งเมื่อทำให้หมดฤทธิ์ก่อโรคก็สามารถใช้เป็นวัคซีนได้ ต่อมามีการใช้เซลล์ไลน์ (continuous cell line) แทนเซลล์ปฐมภูมิ ซึ่งมีข้อดีกว่าคือ สามารถควบคุมสภาวะการเลี้ยงเซลล์ได้ดีกว่า เซลล์เพิ่มจำนวนได้ง่ายและมากกว่า อีกทั้งสามารถเก็บแช่แข็งเป็นธนาคารเซลล์ได้ ปัจจุบันมีไวรัสวัคซีนหลายชนิดที่ผลิตจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์เพื่อโปรตีนที่ต้องการมีค่าใช่จ่ายสูง อีกทั้งการเลี้ยงเซลล์สัตว์ก็เป็นศาสตร์ที่ละเอียดอ่อน และล้มเหลวได้ง่าย เพื่อลดต้นทุนการผลิตโปรตีน และเพื่อให้การผลิตโปรตีนมีวิธีที่ง่ายขึ้น จึงมีความพยายามที่จะใช้พันธุวิศวกรรมร่วมกับการโคลนนิ่งมาสร้างสัตว์ให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการในน้ำนมของสัตว์แทน โดยโปรตีนบางชนิดไม่เคยผลิตมาก่อน เช่น โปรตีนจากใยแมงมุม (spider silk) ก็สามารถให้ผลิตตามความต้องการได้ นอกจากนี้รายงานการโคลนนิ่งแกะดอลลี่ในปี ค.ศ. 1997 ด้วยวิธีการถ่ายย้ายนิวเคลียสของเซลล์เต็มวัย ทำให้มีการทำโคลนนิ่งในสิ่งมีชีวิตอีกหลายชนิด โดยเฉพาะการใช้พันธุวิศวกรรมและโคลนนิ่งมาสร้างสัตว์ที่เป็นแบบจำลองในการรักษาโรค หรือใช้เป็นแหล่งของอวัยวะเทียม นอกจากนี้ การใช้เทคนิคการย้ายนิวเคลียสร่วมกับการโคลนนิ่ง สามารถเปิดโอกาสให้มีการผลิตเซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนได้ ซึ่งมีประโยชน์มากมายในการนำไปใช้ในรักษาโรคที่เกิดจากการชำรุดของเซลล์ต่างๆในร่างกาย หรือนำไปทำอวัยวะเทียมเพื่อใช้เป็นอะไหล่ในการรักษาโรค หรือซ่อมแซมอวัยวะที่เสียหายของผู้ป่วยได้ ดังนั้นเทคนิคการเพาะเลี้ยงจึงถูกประยุกต์ใช้ในงานต่าง ๆ มากมายสรุปได้ดังนี้

1) ใช้ศึกษาหาความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับชีววิทยา และชีวเคมีของเซลล์
2) ใช้ในการวิเคราะห์หาความปลอดภัยของสารแทนการทดลองในสัตว์
3) ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ
4) ใช้ในการรักษาโรคพันธุกรรม
5) ใช้ในการตรวจหาความผิดปกติของทารกในครรภ์
6) ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์หรือรักษาพันธุ์สัตว์โดยการทำโคลนนิ่ง
7) ใช้ในการสร้างเป็นอวัยวะหรือเนื้อเยื่อเทียมในการปลูกถ่ายรักษาผู้ป่วย

2.4.3 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์เพาะเลี้ยง

การศึกษาเซลล์ ในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถให้ข้อมูลที่มีความถูกต้อง และเป็นผลซ้ำดีกว่าเซลล์ในสัตว์ทดลอง หากมีการใช้กลุ่มเซลล์ที่อยู่ในโคโลนีหรือโคลนเดียวกัน ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็น homogeneous ทำให้การวิเคราะห์ทางวิชาเคมี การตรวจลักษณะพันธุกรรม การติดตามการเจริญ และการวัดความมีชีวิตของเซลล์ สามารถทำได้ง่ายมากกว่าเซลล์ในเนื้อเยื่อซึ่งเป็นกลุ่มประชากรเซลล์ที่มีความแตกต่างกัน (heterogeneous) นอกจากนี้ ในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ เซลล์สัตว์สามารถมีปฏิกิริยาโดยตรงกับสารทดลองในขณะที่การใช้สัตว์ทดลองอาจเกิดการสูญเสียสารทดลองไปประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ จากระบบการทำงานของร่างกาย และปริมาณสารที่เหลืออาจมีผลกระทบกับเซลล์หลาย ๆ ชนิด แทนที่จะเป็นเฉพาะชนิดที่ต้องการทดสอบ ดังนั้นการใช้เซลล์สัตว์จึงประหยัดและให้ผลดีกว่า เนื่องจากสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศึกษาได้หลายปัจจัย ศึกษาซ้ำกันได้ เป็นวิธีที่มีราคาถูก และไม่ต้องเกี่ยวข้องกับปัญหาของจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

นอกจากนี้ ในการผลิตผลิตภัณฑ์ชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม การใช้เซลล์เพาะเลี้ยงจะมีข้อดีกว่า เนื่องจากสามารถควบคุมสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงได้ เช่น ความเป็นกรด – ด่าง (pH) อุณหภูมิ ความตันออสโมติค ความเข้มข้นของ O_2 และ CO_2 ได้ค่อนข้างแน่นอน อีกทั้งสามารถเลือกอาหารให้เหมาะกับเซลล์แต่ละชนิดได้ โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์มีทั้งแบบทราบความเข้มข้นของแต่ละองค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิด (defined) และไม่ทราบความเข้มข้นของสารองค์ประกอบของอาหาร (undefined) ทำให้สามารถควบคุมการผลิต และหลีกเลี้ยงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และโปรตีนที่ไม่ต้องการได้ง่ายกว่าการใช้เนื้อเยื่อของสัตว์

2.5 อาหารเลี้ยงเซลล์ กัลยาณี (2550)

การเลี้ยงเซลล์นอกร่างกายสิ่งมีชีวิตให้มีชีวิตรอดและเจริญได้ สารละลายอาหารจะต้องมีคุณสมบัติที่สำคัญ คือ รักษาระดับพีเอช และ osmolarity ที่จำเป็นต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ อีกทั้งให้สารอาหารและพลังงานที่จำเป็นต่อการเจริญแบ่งตัวของเซลล์ โดยองค์ประกอบของอาหารควรมีสัดส่วนของสารต่าง ๆ อย่างเหมาะสม สมดุล และไม่มีองค์ประกอบของสารที่เป็นพิษหรือยับยั้งการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ อาหารเลี้ยงเซลล์ในสภาวะการบ่มเลี้ยง ควรสามารถควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณ O_2 และ CO_2 ได้อย่างเหมาะสมต่อการอยู่รอดและเจริญของเซลล์ โดยทั่วไปสารละลายที่ใช้งานในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ สามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามวัตถุประสงค์การใช้งาน คือ 1) สารละลายที่ช่วยให้เซลล์อยู่รอดโดยไม่มีการเจริญ เช่น balanced salt solution และ 2) สารละลายที่ช่วยให้เซลล์อยู่รอดและเจริญได้ หรืออาหารเลี้ยงเซลล์ เช่น basal medium และ complete medium ซึ่งอาจเป็นอาหารที่ปราศจากซีรัม หรือมีซีรัม

2.5.1 อาหารพื้นฐาน

อาหารเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดปัจจัยหนึ่งในการเลี้ยงเซลล์สัตว์ โดยให้สภาพ แวดล้อมที่ให้เซลล์อยู่รอด และให้สารที่เซลล์ต้องการ ซึ่งเซลล์เองไม่สามารถผลิตได้ อาหารที่ให้เลี้ยงเซลล์ในช่วงแรก ๆ มีองค์ประกอบของสารหลายชนิดแปรตามวัตถุดิบที่ใช้ เช่น พลาสมา (plasma), lymph ซีรัม (serum) และสารสกัดจากเนื้อเยื่อ แต่อาหารที่นิยมให้เลี้ยงเซลล์ในปัจจุบัน เป็นอาหารที่รู้ส่วนประกอบทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ หรือ defined medium ซึ่งสามารถเตรียมได้ตามหลักมาตรฐานทางวิทยาศาสตร์ อาหารที่มีองค์ประกอบของสารต่าง ๆ น้อยที่สุด และมีเท่าที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์เท่านั้นจึงจัดเป็นอาหารพื้นฐาน ซึ่งบางชนิดเป็นอาหารที่ไม่ต้องเติมซีรัม แต่ส่วนใหญ่เป็นอาหารที่ต้องเติมซีรัม และมักเรียกอาหารที่เติมซีรัมแล้วว่า complete media

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารพื้นฐานแบ่งเป็น 4 หมวดหมู่ สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และอีกหลายหมวดหมู่สำหรับใช้เลี้ยงเซลล์แมลง โดยอาหารพื้นฐานที่ใช้เลี้ยงเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีดังนี้

2.5.1.1 Eagle's medium และอนุพันธ์ (derivatives) เช่น BME (basal medium Eagle's), EMEM (minimum essential medium with Earl's salts), AMEM (minimum essential medium with alpha modification), DMEM (Dulbeco's modified Eagle's medium) (รูปที่ 2.5), GMEM (Glasgow modification of Eagls's medium) และ JMEM (minimum essential medium with joklik's modification)

2.5.1.2 อาหารที่ออกแบบพัฒนาที่ Roswell Park Memorial Institute (RPMI) เช่น RPMI 1692, RPMI 1630 และ RPMI 1640

2.5.1.3 อาหารพื้นฐานที่ออกแบบเพื่อให้หลังการใส่ซีรัมเสริม เช่น Fisher's, Liebovitz, Trowell และ Williams

2.5.1.4 อาหารพื้นฐานที่ออกแบบใช้เป็นสูตรอาหารที่ปราศจากซีรัม เช่น CMRL 1060, Ham's F10 และอนุพันธ์ของ Ham's F10, TC 199 และอนุพันธ์ของ TC 199, MCDB และอนุพันธ์ของ MCDB, NCTC และ Waymonth

รูปที่ 2.5 อาหาร DMEM (www.hyclone.com/news/rsm.html)

2.5.2 ซีรัม

ซีรัมเป็นของเหลวที่ได้จากการแข็งตัวของเลือดสัตว์ มีองค์ประกอบหลาย ๆ ชนิดที่เป็นชีว-โมเลกุลซับซ้อนทั้งขนาดใหญ่และเล็ก ที่มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่น เป็นสารอาหาร ฮอร์โมน growth factors, attachment factor, spreading factor, binding proteins ที่นำฮอร์โมน วิตามิน ไขมัน และแร่ธาตุเข้าเซลล์ นอกจากนี้ยังมีสารให้ความหนืดป้องกันเซลล์ สารยับยั้งการทำงานของโปรติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอส (protease inhibitor) และพีเอชบัฟเฟอร์ (pH buffer) จึงนิยมใส่ซีรัมในอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ เพราะมีสารเร่งการเจริญ (growth factors) ในปริมาณที่สูง และมีแกมม่าโกบูลินในปริมาณที่ต่ำ โดยซีรัมที่เป็นตัวมาตรฐานที่นิยมใช้ คือ fetal bovine serum (FBS) และมักใช้ที่ความเข้มข้น 5 – 20 เปอร์เซ็นต์

2.6 เทคนิคพื้นฐานสำหรับการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยง กัลยาณี (2550)

2.6.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

เซลล์สัตว์ไม่ว่าจะเป็นเซลล์เกาะผิว (anchorage dependent cell) หรือเซลล์แขวนลอย (suspended cell) มีปัจจัยที่ให้ผลต่อลักษณะการเจริญของเซลล์แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ อาหารเลี้ยงเซลล์ และวิธีการเลี้ยงเซลล์ โดยเซลล์ตั้งต้นมักใช้ที่ความหนาแน่น $10^4 - 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเซลล์จะเจริญในสภาวะเลี้ยงแบบปิด (batch) ให้ได้ความหนาแน่นเซลล์เป็น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หรือมีความหนาแน่นเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าภายในระยะเวลาเลี้ยง 3 – 4 วัน โดยหลังจากใส่เซลล์เริ่มต้นต้องให้เซลล์เกาะกับพื้นผิวเป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมงในการเพาะเลี้ยงเซลล์เกาะผิว ซึ่งเซลล์จะเกาะแผ่ให้ลักษณะเฉพาะของเซลล์เกาะผิวขึ้น เมื่อบ่มเลี้ยงเซลล์ต่อไปเซลล์จะเจริญและหยุดการเจริญเมื่ออาหารจำกัด หรือมีพื้นที่ผิวจำกัด หรือมีการสะสมเมตาโบไลต์ที่เป็นพิษ ดังนั้นหากมีการเปลี่ยนอาหารหลังการใส่กล้าเซลล์ 2 – 3 วัน อาจทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ที่เลี้ยงเพิ่มสูงขึ้นได้ เซลล์ในภาชนะเลี้ยงที่หยุดการเจริญ จะถ่ายเลี้ยงให้เจริญในอาหารใหม่ต่อไปโดยใช้เซลล์ส่วนหนึ่งจากภาชนะเดิมเป็นเซลล์ตั้งต้น ซึ่งควรทำการถ่ายเลี้ยงภายในวันที่เซลล์ได้ความหนาแน่นเซลล์สูงสุด เพื่อให้แน่ใจว่าเซลล์สามารถเจริญต่อได้ในการเลี้ยงใหม่ ทั้งนี้ เนื่องจากเซลล์อาจสูญเสียความมีชีวิตได้หากคงเซลล์ไว้เป็นเวลานานก่อนการถ่ายเลี้ยงเซลล์ การถ่ายเลี้ยงเซลล์แขวนลอยสามารถทำได้ง่าย ๆ ด้วยการเจือจางเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง ๆ ด้วยอาหารใหม่ และมักทำการเจือจางเป็น 2 – 10 เท่า ซึ่งเหมาะสมให้กล้าเซลล์เจริญดี โดยอาหารที่เลี้ยงควรมีสภาวะเหมาะสม คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอชประมาณ 7.4 แต่การถ่ายเลี้ยงเซลล์เกาะผิวต้องให้เซลล์หลุดจากการยึดเกาะบนพื้นผิวก่อน จากนั้นจึงนำเซลล์ที่แขวนลอยไปใส่ในอาหารเลี้ยงใหม่ ซึ่งสามารถทำได้ด้วยกระบวนการ trypsinization โดยการใช้ proteolytic enzyme เช่น ทริปซินไปย่อยสลายโปรตีนที่ใช้ยึดเกาะกับพื้นผิว โดยไม่ควรบ่มนานเกินไปเพราะจะก่อให้เกิดการทำลายเซลล์ได้ อาจบ่มนาน 5 – 10 นาที และอาจเคาะภาชนะเพื่อช่วยให้เซลล์หลุดเร็วขึ้นได้ นอกจากนี้การไม่มีสารยับยั้งทริปซิน รวมทั้งอิออนของแคลเซียมและแมกนีเซียมในอาหารเลี้ยง จะทำให้ประสิทธิภาพการดึงเซลล์ออกจากพื้นผิวเกิดได้ดีขึ้น ดังนั้นจึงควรล้างผิวแผ่นเซลล์ก่อนด้วยสารละลาย PBS ที่ปราศจาก Ca^{2+} และ Mg^{2+} อิออน โดยเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแน่นมาก ๆ อาจนำเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกจากการเกาะผิวได้ด้วยทริปซินที่ผสม EDTA (trypsin/EDTA) และหากเซลล์จับกับพื้นผิวไม่แน่นมาก อาจนำเซลล์ออกโดยใช้เพียง EDTA เมื่อเซลล์หลุดจะทำให้ทริปซินหมดฤทธิ์ด้วยการใส่อาหารที่มีซีรัม หรือปั่นเหวี่ยงกำจัดทริปซินออกจากเซลล์ แต่กรณีที่เซลล์ถูกบ่มเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากซีรั่ม อาจหยุดการทำงานของทริปซินด้วย soybean trypsin inhibitor ได้

2.6.2 การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยง

การรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถทำได้ดังนี้

2.6.2.1 การเปลี่ยนถ่ายอาหารและปัจจัยที่ควรพิจารณาเมื่อเปลี่ยนอาหารในเซลล์เพาะเลี้ยง

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม สามารถส่งเสริมให้เซลล์เกิดการเจริญ มีเมตาโบลิซึม และเกิด differentiation สารอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์จะถูกใช้ไปหรือเสื่อมไปตามระยะเวลาการบ่มเลี้ยง ขณะเดียวกันก็ให้เมตาโบไลต์สะสมอยู่ในสารละลายอาหาร จึงควรมีการเปลี่ยนอาหารเพื่อให้มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม โดยทั่วไปการเปลี่ยนอาหารมีจุดประสงค์อยู่ 3 ประการ คือ

1) เพื่อใส่อาหารที่จำเป็น หรือสารอาหารที่มีปริมาณขาดแคลน และจำเป็นต่อการกำลังเจริญและการผลิตสารของเซลล์

2) เพื่อกำจัดหรือเจือจาง metabolites ที่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ หรือสารยับยั้งการเจริญของเซลล์ออกไป

3) เพื่อช่วยปรับระดับพีเอชในสารละลายอาหาร ไม่ให้เป็นกรดมากไป

การเปลี่ยนอาหาร ควรมีความถี่ในการเปลี่ยนมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ อัตราการเจริญและเมตาโบลิซึมของเซลล์ ความหนาแน่นของเซลล์ ชนิดของอาหาร และปริมาณก๊าซในสภาวะการเลี้ยง เช่น เซลล์ปกติสามารถอยู่ในช่วง G1 ของวงจรเซลล์ เมื่อสารให้การเจริญหมดและมีชีวิตรอดเป็นระยะเวลานาน 2 – 3 อาทิตย์ได้โดยไม่มีผลเสียต่อเซลล์ ขณะที่ transformed cells, continuous cell lines และ embryonic cells บางชนิดจะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว จึงต้องรีบเปลี่ยนอาหารเพื่อให้เซลล์อยู่รอด มีอัตราการเจริญและเมตาโบลิซึมดังเดิม เช่น PS 388 เป็นเซลล์ที่มีเมตาโบลิซึมสูงกว่า HeLa cell และมีความต้องการอาหารใหม่ หลังจากการ subculture แล้ว 3 วัน ขณะที่เวลาการเปลี่ยนอาหารของ HeLa cell ควรทำหลังจาก subculture แล้ว 5 – 7 วัน นอกจากนี้ความหนาแน่นของเซลล์ที่จำนวนเซลล์สูง ๆ มีความต้องการให้เปลี่ยนอาหารบ่อยกว่าที่ความหนาแน่นเซลล์น้อย ๆ โดยทั่วไปการเปลี่ยนถ่ายอาหารในการเลี้ยงเซลล์เกาะผิวสามารถทำได้ง่าย ๆ โดยดูดอาหารเก่าออก แล้วแทนที่ด้วยอาหารใหม่ ส่วนการเปลี่ยนถ่ายอาหารแก่เซลล์แขวนลอย ต้องปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ เทอาหารเก่าทิ้ง แล้วใส่อาหารใหม่ ซึ่งการเปลี่ยนอาหารอาจทำโดย เปลี่ยนอาหารทั้งหมด หรือเปลี่ยนอาหารเป็นบางส่ง แต่การเปลี่ยนอาหารเป็นบางส่วนจะให้ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่ดีกว่า เนื่องจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจะไม่ได้รับผลกระทบจากค่าที่เปลี่ยนแปลงไปมากจากความเข้มข้นของสารอาหาร และพีเอชโดยทั่วไปนิยมเปลี่ยนอาหารประมาณ 50% ของปริมาตรทั้งหมดในระยะเวลาทุก ๆ 3 – 5 วัน วิธีการเปลี่ยนอาหารเช่นนี้เหมาะกับระบบเลี้ยงเซลล์ขนาดเล็กประมาณ 3 – 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่กรณีที่เซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วอาจจำเป็นต้องเปลี่ยนอาหารบ่อย ๆ หรือเปลี่ยนอาหารทั้งหมดแทน ซึ่งการเปลี่ยนที่ต้องการความบ่อยครั้งมากเช่นนี้ ควรใช้ระบบการเปลี่ยนอาหารแบบต่อเนื่อง (continuous) แทน

2.6.2.2 การถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ เป็นวิธีการรักษาเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีทั้งข้อดีและข้อเสีย (ตารางที่ 2.1) โดยเซลล์เริ่มต้นที่ถ่ายสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ อาจมีการนับเซลล์ให้มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่แน่นอน เช่น กรณีการถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงจำนวน 2 – 3 ภาชนะ ซึ่งจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ควรมีความหนาแน่นเซลล์น้อย ๆ ที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการเจริญแบ่งตัวโดยมี lag phase สั้น ๆ และเข้าสู่ช่วง log phase ได้เร็ว (มี population doubling time สั้น ๆ) และเข้าสู่ช่วงสูงสุดของ log phase ในช่วงเวลาเหมาะสมต่อการเลี้ยงเซลล์ (subculture) ครั้งต่อไปได้ นั่นคือความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ประเภท finite cell line ควรเป็น 1 x 10^4 – 5 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกรณีเป็นเซลล์ที่บอบบาง ควรมีความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็นต้น หรืออาจถ่ายเลี้ยงเซลล์โดยวิธีใช้เซลล์เริ่มต้นจากหนึ่งภาชนะ (โดยไม่ได้นับเซลล์) ไปกระจายสู่ภาชนะเลี้ยงหลาย ๆ ภาชนะ ด้วยอัตราส่วนของเซลล์เริ่มต้นเท่า ๆ กัน (split ratio) ซึ่งเป็นวิธีการเพาะเลี้ยงที่ต้องการให้มีเซลล์ในแต่ละภาชนะเลี้ยงเหมือน ๆ กัน ซึ่งเหมาะกับการทดลองที่ต้องการ replicate sample การเจือจางเซลล์เริ่มต้นให้สามารถถ่ายเลี้ยงสู่ภาชนะใหม่เป็น 2, 4, 8 หรือ 16 ภาชนะ (จำนวนเท่า) มีประโยชน์ต่อการหาอายุของเซลล์ เช่น การกระจายเซลล์ให้ได้ 2 ภาชนะ จาก 1 ภาชนะ (split ratio เป็น 1:$2,2^n$ โดยที่ n = 1) เซลล์ที่เจริญเต็มที่จะมีขั้นอายุเป็น 1 และเป็น 2, 3, 4 จากการกระจายเซลล์ที่มี split ratio เป็น 1:4 (2^n, n = 2), 1:8 (2^3, n = 3) และ 1:16 (2^4, n = 4) ตามลำดับอย่างไรก็ตามการถ่ายเลี้ยงเซลล์ควรใช้ split ratio เป็น 2 – 4 ในครั้งแรก ๆ และอาจเพิ่ม split ratio ขึ้นเมื่อมีความชำนาญ โดย split ratio ที่ใช้ต้องไม่ก่อให้เกิดการเจือจางเซลล์จนต่ำกว่าระดับที่กระตุ้นเซลล์ให้เข้าสู่วงจรเซลล์ช้ากว่า 24 ชั่วโมง และต้องไม่เป็นเซลล์เริ่มต้นที่ให้เซลล์เข้าสู่ stationary phase ก่อนเวลา subculture ครั้งต่อไป

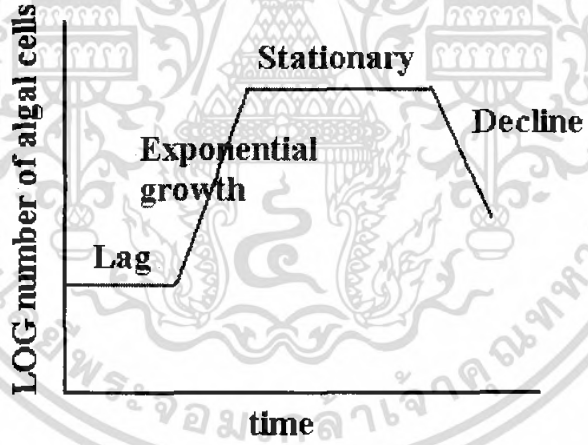
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 2.1 ข้อดี และ ข้อเสียของการ subculture

ข้อดี	ข้อเสีย
- เซลล์มีการเจริญได้จำนวนเซลล์มากขึ้น - เซลล์มีชนิดเดียวเป็น homogeneity เมื่อทำโคลนนิ่ง - กระจายให้ได้เซลล์ที่เป็น replicate sample	- เกิดการคัดเลือกเซลล์ที่เจริญรวดเร็ว และสูญเสียคุณสมบัติ differentiation - เซลล์มีพันธุกรรมไม่คงที่ และเกิดความเสียหายจากการ subculture - เซลล์มีอายุหรือความสามารถในการถ่ายเลี้ยงลดลง

2.6.3 การเจริญของเซลล์เพาะเลี้ยง เซลล์ปกติจะมีรูปแบบการเจริญเป็นแบบซิกมอยด์ (sigmoidal) ที่ประกอบด้วยระยะ lag, log, stationary (plateau) และ decline phase ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การเจริญของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เป็นเซลล์ปกติ

(http://www.esf.edu/efb/schulz/Limnology/growthcurve.JPG)

Lag phase เป็นช่วงระยะเวลาแรกเริ่มหลังการใส่กล้าเชื้อ (inoculum) ซึ่งเซลล์จะไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวน ระยะนี้จะเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ปัจจัยการเจริญให้มีความเข้มข้นเหมาะสมที่กระตุ้นให้เซลล์เกิดการแบ่งตัวได้ ดังนั้นช่วงเวลาของระยะนี้จะนานหากใส่กล้าเชื้อของเซลล์จำนวนน้อย หรือเซลล์มีความมีชีวิตต่ำ หรือมีการถ่ายเลี้ยงช้าไป ซึ่งจะทำให้เซลล์ต้องปรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83998

สภาพแวดล้อมก่อน จึงทำให้มีระยะ lag phase ยาวนาน ส่วนการใส่กล้าเชื้อที่เป็นเซลล์แข็งแรงอยู่ในช่วงการแบ่งตัว มีความหนาแน่นเซลล์มาก และมีความมีชีวิตของเซลล์สูง ก็จะทำให้มีระยะ lag phase สั้นลง

Logarithmic (log) growth phase เป็นช่วงเวลาที่เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และเพิ่มจำนวนเซลล์แบบทวีคูณ (exponential) เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในวงจรเซลล์ (cell cycle) มีปริมาณมากถึง 90 – 100 เปอร์เซ็นต์ เซลล์ในช่วง log phase จึงเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะที่แข็งแรงที่สุด และนิยมใช้ในการศึกษาหน้าที่ของเซลล์ หรือศึกษาผลกระทบของสาร เช่น การศึกษาผลของยาต่อการเจริญของเซลล์ การหา population doubling time ของเซลล์ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์นั้น ๆ โดยต้องคำนึงว่าระยะของ log phase ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น จำนวนความหนาแน่นของเซลล์เริ่มต้น อัตราการแบ่งตัวของเซลล์ และความหนาแน่นอิ่มตัว (saturation density) ของเซลล์

Plateau (stationary) phase เซลล์เข้าสู่ plateau phase เมื่ออัตราการเจริญของเซลล์ค่อย ๆ ลดลงจากการขาดแคลนอาหารหรือมีการสะสมของสารยับยั้ง หรือมีการเจริญของเซลล์แผ่เต็มพื้นผิวทั้งหมด (confluence) เซลล์ในระยะนี้มีเมตาโบลิซึมสูงแม้ไม่มีการเจริญ จึงมักเป็นระยะที่เลี้ยงเซลล์เพื่อผลิตโปรตีนที่ต้องการ เซลล์ระยะ plateau phase มีแนวโน้มให้อัตราการแบ่งตัวของเซลล์เท่ากับอัตราการตายของเซลล์ และจำนวนเซลล์ที่อยู่ในวงจรเซลล์ในระยะนี้มีจำนวนลดลงถึง 0 – 10 เปอร์เซ็นต์ เซลล์บางชนิดสามารถยืดระยะเวลาช่วง plateau phase ถ้ามีการเปลี่ยนอาหารให้เซลล์ได้รับเพียงพอ ช่วงระยะเวลานี้ไม่ถาวร และเซลล์ในระยะนี้อ่อนแอ อาจจะถูกทำลายได้ง่าย

Decline phase เป็นช่วงระยะเวลาหลัง plateau phase ซึ่งจำนวนเซลล์มีชีวิตลดลง เนื่องจากการแบ่งตัวของเซลล์เกิดขึ้นน้อยกว่าการตายของเซลล์ โดยทั่วไปเซลล์ที่เพาะเลี้ยง และเซลล์ในร่างกายจะเกิดการตายได้ทั้งแบบ apoptosis หรือ necrosis โดย apoptosis เป็นกลไกทางพันธุกรรมที่กำหนดให้เซลล์ตายเมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บเล็กน้อย ซึ่งในสภาวะการเพาะเลี้ยงสามารถเกิดการตายลักษณะนี้ได้จากการขาดแคลนอาหารสำคัญ โดยเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis จะมีลักษณะเฉพาะ คือ เมมเบรนของเซลล์จะไม่เรียบและเสียรูป มีการหดของเซลล์ และท่อนดีเอ็นเอถูกห่อหุ้มด้วยเมมเบรมให้เป็นถุงเล็ก ๆ เรียกว่า apoptotic bodies ส่วนการตายแบบ necrosis เกิดขึ้นจากการที่เซลล์บาดเจ็บอย่างรุนแรง หรือได้รับสภาวะเค้นรุนแรงทันทีที่ทำให้เมมเบรนถูกทำลาย เซลล์บวมและแตกในที่สุด

2.6.3.1 การวัดการเจริญของเซลล์

การศึกษาการเจริญของเซลล์เป็นการติดตามจำนวนเซลล์มีชีวิตที่ช่วงเวลาต่าง ๆ ซึ่งมีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ ทำให้ทราบคุณสมบัติการแบ่งตัวของเซลล์เพาะเลี้ยง ระยะ เวลาที่ดีที่สุดในการถ่ายเลี้ยงเซลล์ ค่าการเจือจางเซลล์ที่เหมาะสม และค่าการเจริญเป็นกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ (plating efficiency) ของเซลล์ที่ความหนาแน่นเซลล์ต่าง ๆ ซึ่งมีประโยชน์ในการนำเซลล์ไปใช้ในการศึกษา เช่น การตรวจสอบซีรัม อาหาร ภาชนะเลี้ยง ฯลฯ

1) การคำนวณอายุของเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ปกติ (normal cell) มีช่วงอายุจำกัด การเจริญของเซลล์ปกติในสภาวะนอกร่างกายสิ่งมีชีวิตจะมีการเปลี่ยนแปลงตามรุ่น (generation) ของเซลล์ที่เกิดถัด ๆ ไปเช่นกัน ตัวอย่างเช่น ลักษณะการกระจายของเซลล์เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้นเมื่อมีการถ่ายเลี้ยงเซลล์มากครั้งขึ้น เนื่องจากเซลล์แต่ละช่วงของการถ่ายเลี้ยงมีความไม่คงที่ตลอดช่วงอายุเซลล์ จึงจำเป็นที่ต้องทราบอายุของเซลล์ที่เจริญนอกร่างกายสิ่งมีชีวิต โดยอาจทำการทดลองหลาย ๆ ชุด ภายในช่วงอายุของเซลล์ที่เลือกใช้ เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ถูกต้องกับเซลล์ในระบบนั้น ๆ

การบอกอายุของเซลล์มี 2 วิธี คือ 1) passage ซึ่งใช้บอกจำนวนครั้งที่เซลล์ได้ผ่านการถ่ายเลี้ยงซึ่งสามารถใช้ประมาณอายุของเซลล์ได้ และ 2) cumulative population doubling ซึ่งเป็นการคำนวณหาจำนวนขั้นอายุของเซลล์ แสดงจำนวนครั้งการแบ่งตัวทวีคูณซึ่งเป็นค่ารวมของจำนวนขั้นอายุในระหว่างที่เซลล์เจริญ กับค่าการแบ่งตัวทวีคูณที่เป็นของเดิม นิมยมบันทึกค่า cumulative PDL บนขวดเลี้ยงเซลล์ เพื่อสะดวกต่อการติดตามอายุเซลล์ในแต่ละครั้งที่มีการถ่ายเลี้ยงเซลล์

2) อัตราการแบ่งตัว และเวลาการแบ่งตัวทวีคูณของเซลล์

ข้อมูลที่แสดงคุณสมบัติการเจริญของเซลล์ในช่วง log phase คือ (1) อัตราการแบ่งตัว [multiplication rate ; (r)] ซึ่งเป็นจำนวนชั้นอายุที่เกิดขึ้นในหนึ่งหน่วยเวลา และมักแสดงในรูปเวลาแบ่งตัวทวีคูณต่อ 24 ชั่วโมง (2) เวลาการแบ่งตัวทวีคูณ (population doubling time ; PDT) เป็นเวลา(ชั่วโมง) ที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า ซึ่งเป็นค่าส่วนกลับของอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ (1/r)

จำนวนชั้นอายุ อัตราการแบ่งตัว และเวลาแบ่งตัวทวีคูณ ใช่บ่งบอกคุณสมบัติการแบ่งตัวของประชากรเซลล์ทั้งหมด แต่ไม่ได้บอกถึงวงจรการแบ่งตัวของเซลล์แต่ละเซลล์ อย่างไรก็ตาม อาจใช้ค่า PDT ประมาณเวลาวงจรของเซลล์ และหาระยะเวลาแต่ละช่วง (phase) ในวงจรเซลล์ ได้

2.6.3.2 การนับจำนวนเซลล์

ในการเลี้ยงเซลล์จำเป็นต้องทราบจำนวนเซลล์เริ่มต้น และจำนวนเซลล์ทั้งหมดหลังการเลี้ยง วิธีที่ใช้ทั่วไปในการนับเซลล์แขวนลอยมี 2 วิธี คือ (1) การใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

haemocytometer คือนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา และ (2) การใช้เครื่องมือกึ่งอัตโนมัติที่เป็น electronic particle counter ที่เรียกว่า coulter counter

1) การนับโดยใช้ Heamocytometer (รูปที่ 2.7)

การนับเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกที่สุด ซึ่งสามารถใช้ตรวจเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิต และเซลล์ตายได้ โดยการใช้เทคนิคสีย้อมที่เรียกว่า dye - exclusion method ซึ่งทำให้เซลล์ตายติดสี ขณะที่เซลล์เป็นไม่ติดสี Haemocytometer เป็นสไลด์ที่ดัดแปลงให้มีพื้นที่เรียบ (polished) สองบริเวณ ซึ่งแต่ละบริเวณมีตาราง (grid) ในแต่ละ 1 ตาราง มีช่องสี่เหลี่ยมอยู่ภายใน 9 ช่อง โดยแต่ละด้านของสี่เหลี่ยมเล็กมีขนาด 1 มิลลิเมตร ดังนั้น 1 ตารางสี่เหลี่ยมเล็กจึงมีพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร และแต่ละตารางจะมีเส้นบอกขอบเขตเป็นเส้น 3 เส้น (ซึ่งห่างกัน 2.5 μm) เส้นสามเส้นนี้ใช้เป็นหลักในการนับเซลล์ใน 1 ตาราง โดยแต่ละช่องตารางสี่เหลี่ยมทั้ง 9 ช่องนี้ยังแบ่งย่อยลงไปเป็นช่องเล็ก ๆ เพื่อง่ายต่อการนับ และช่องตารางที่มีเส้นเพิ่มเติมเป็นทาง ๆ มักไม่นิยมใช้ในการนับเซลล์ ขอบสองด้านของพื้นผิวบริเวณตารางที่ใช้นับเซลล์จะถูกยกสูง 0.1 มิลลิเมตร เมื่อวาง cover slip และด้านหน้าบริเวณพื้นที่ตารางนับเซลล์จะมีช่องเป็นฟันฉลาม 1 ช่อง เพื่อที่เซลล์แขวนลอยผ่านไปสู่ตารางได้ด้วยแรง capillary เมื่อใส่สารละลายตัวอย่างเซลล์

- เพราะฉะนั้น จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร = (จำนวนเซลล์ทั้งหมด/10) x 10^4 x ค่าการเจือจาง

% ความมีชีวิต = (จำนวนเซลล์มีชีวิต / จำนวนเซลล์ทั้งหมด) x 100

รูปที่ 2.7 Haemacytometer (www.aqua.ait.ac.th)

2) Electronic particle counting

การนับเซลล์ที่แขวนลอยในสารละลาย สามารถนับได้ถูกต้องแม่นยำ และรวดเร็วโดยใช้เครื่องนับอนุภาค เช่น coulter counter ซึ่งนับเซลล์ได้มากครั้งกว่า haemocytometer ในระยะเวลาเท่ากัน และนับเซลล์ได้ในปริมาตรที่มากกว่า นอกจากนี้เครื่องมือนี้สามารถวัดขนาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ ทำให้ทราบถึงขนาดต่าง ๆ ของเซลล์ที่กระจายอยู่ในสารละลายเซลล์แขวนลอยได้ เครื่องวัดอนุภาคอิเลคโทรนิคมีหลักการทำงาน คือ เซลล์ที่แขวนลอยในสารละลายอิเลคโตรไลท์ปริมาตรหนึ่ง ถูกนำให้ผ่านช่องแคบ ๆ (orifice) ขนาด 20 – 200 μm ที่มีกระแสไฟฟ้าค่าหนึ่งผ่านอยู่ด้วย การควบคุมที่เกิดจากการทำงานของ value, manometer และเครื่องสูบ เมื่อเซลล์ผ่านช่องแคบนั้นจะทำให้เกิดการนับเซลล์ไปเรื่อย ๆ จนของเหลวปริมาตรนั้นไหลผ่านหมด โดยขณะที่เซลล์ผ่าน orifice จะทำให้กระแสไฟฟ้าสลับเพิ่มมากขึ้น และเกิดจังหวะแรงดันไฟฟ้า ซึ่งเมื่อนำไปขยายและนับจำนวนจังหวะกระแสไฟฟ้า (pulse) ภายในช่วงเวลาการนับเซลล์ จะให้ผลแสดงบนเครื่องวัดกระแสไฟฟ้าสลับ (oscilloscope) นอกจากนี้ขนาดของเซลล์ก็สามารถตรวจสอบกลับได้เพราะขนาดของ pulse เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาตรของเซลล์ เซลล์ที่เกาะกลุ่ม และเศษเซลล์ก็ให้ pulse เช่นกัน ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงการนับที่ไม่ต้องการนี้ได้โดยการปรับขนาดของ pulse ให้อยู่ในช่วงที่ต้องการ การวัดโดยวิธีนี้ให้ผลแม่นยำรวดเร็วกว่าสไลด์นับเซลล์

การนับเซลล์โดยใช้เครื่อง coulter counter แม้สามารถนับเซลล์ได้รวดเร็วและแม่นยำ แต่สารละลายเซลล์แขวนลอยที่นับต้องเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ และมีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ รวมทั้งไม่ควรมีฟองอากาศและฝุ่นผงในขณะที่นับ นอกจากนี้อาจมีปัญหาอื่นเกิดขึ้นระหว่างการนับ เช่น การอุดตันของช่อง orifice ที่อาจทำให้เครื่องหยุดนับหรือมีการนับช้าลง เครื่องสูบไม่ทำงาน และหน้าจอแสดงอาการรวบกวนจากเครื่องมือไฟฟ้าอื่น เป็นต้น

2.6.3.3 การวัดความมีชีวิตของเซลล์ ความมีชีวิตจะวัดจากการมีกิจกรรมของเซลล์ เช่น การแบ่งตัว การมีเมตาโบลิซึม ซึ่งจะระบุการเจริญของเซลล์ได้ ความมีชีวิตของเซลล์สามารถทำได้ง่าย ๆ ด้วยการใช้วิธี dye exclusion ซึ่งบอกความมีชีวิตของเซลล์จากการคงสภาพดีของเมมเบรนที่ไม่ให้สีผ่านเข้าไปได้ เช่น trypan blue นอกจากนี้ยังมีสีอื่นที่ใช้วัดความมีชีวิตของเซลล์ เช่น erythrosine B, nigrosin และ fluorescein diacetate

1) Tetrazolium assay เป็นการวัดสีที่เกิดจากกิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการใช้ MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารสีเหลือง ที่เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ dehydrogenase แล้วให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีฟ้าของ formazane โดยเซลล์มีชีวิตจะมีปริมาณ mitochondrial dehydrogenase ในเซลล์หนึ่ง ๆ คงที่ ดังนั้นปริมาณ formazane ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต อย่างไรก็ตาม เซลล์แต่ละชนิดจะให้ผลตอบสนองต่อวิธีนี้ได้แตกต่างกัน และ CHO เป็นเซลล์ไลน์ที่ให้ผลดีกับวิธีนี้

2) Lactate dehydrogenase determination เซลล์ที่สูญเสียความมีชีวิตจะมีกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มมากขึ้น จากการที่เมมเบรนถูกทำลายแล้วทำให้สารโมเลกุลขนาดใหญ่สามารถเข้าและออกจากเซลล์ได้ Lactate dehydrogenase จึงเป็นเอนไซม์ที่ผ่านออกเมมเบรน ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งสามารถวัดค่าได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ในสภาวะที่มี pyruvate และ NADH โดยวัดการลดลงของ NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

3) Adenylate energy charge ค่า energy charge เป็นดัชนีที่ใช้บอกระดับ nucleotides, AMP, ADP และ ATP ภายในเซลล์

4) อัตราการสังเคราะห์โปรตีนและกรดนิวคลีอิก เป็นการวัดกิจกรรมของเซลล์ที่มีชีวิต โดยการบ่มเซลล์ในอาหารที่มีกรดอะมิโนหรือนิวคลีโอไทด์ที่ติดสารรังสี เช่น ^{3}H-leucine, ^{35}S-methionine หรือ tritiated thymidine (^{3}H-TdR)

5) Colony-forming assay เป็นวิธีวัดความมีชีวิตของเซลล์ที่ให้ผลแม่นยำที่สุดกว่าวิธีอื่น ๆ โดยการวัดความสามารถเจริญของเซลล์โดยตรง ซึ่งเซลล์ที่รู้จำนวนความหนาแน่นเซลล์น้อย ๆ จะเกาะ และเจริญบนผิวจานให้เป็นโคโลนีได้ ดังนั้นจึงเรียกวิธีนี้ว่า Colony - forming efficiency (plating efficiency) วิธีนี้ใช้เวลานาน และนิยมใช้ในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ หรือศึกษาแนวโน้มของสารพิษที่ทำให้ความสามารถเกิดโคโลนีของเซลล์ลดลง หรือใช้ประเมินเซลล์ได้

2.6.4 การเก็บรักษาเซลล์และการนำเซลล์กลับมาเลี้ยงใหม่

เซลล์ที่อยู่ในระหว่างการเลี้ยงมักมีความไม่เสถียร มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง หน้าที่ รูปแบบการเจริญ และ Karyotype ได้ เซลล์ไลน์ก็มีการเปลี่ยนแปลงตามอายุเซลล์ บางชนิดอาจมีการเปลี่ยนแปลงเอง (spontaneous transformation) ซึ่งทำให้การเจริญและการแสดงหน้าที่ของเซลล์ผิดไปจากเดิมได้ การเก็บแช่แข็งเซลล์เป็นวิธีที่สามารถเก็บเซลล์ได้นาน โดยไม่ทำให้คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนไป ดังนั้นการทำธนาคารเซลล์สามารถทำได้โดยการแช่แข็งเซลล์ ซึ่งเป็นการดูแลรักษาเซลล์ให้มีคุณสมบัติดังเดิม อีกทั้งเป็นการลดปัญหาโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์หรือจากเซลล์อื่นได้

2.6.4.1 กลไลการแช่แข็งและปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์

การนำน้ำออกจากเซลล์ และการลดอุณหภูมิลงช้า ๆ ในขั้นตอนการแช่แข็งเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์แช่แข็ง ดังนั้นการเก็บเซลล์แช่แข็งจึงต้องคำนึงถึงอัตราการทำให้เย็น ชนิด และความเข้มข้นของ cryoprotectant โดยทั่วไปเซลล์สามารถอยู่รอดจากการแช่แข็งและการละลาย (thawing) ได้ด้วยสารป้องกันที่เรียกว่า cryoprotactive agent เช่น glycerol หรือ dimethylsulphoxide (DMSO) ซึ่งมักมีการใส่ประมาณ 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ในอาหารที่ทำให้เซลล์แขวนลอย สารดังกล่าวมีผลต่อการแพร่ของสารผ่านพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) คือ ให้น้ำออกจากเซลล์ขณะที่อุหภูมิลดลง และสามารถลดจุดเยือกแข็งของสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลง จึงทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์หมด ขณะที่อุณหภูมิลดต่ำลงถึง - 5 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่เกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นภายในเซลล์ที่อาจจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้

การเก็บเซลล์แช่แข็งมักเก็บในหลอดเล็ก ๆ (vial) และจุ่มในไนโตรเจนเหลว วิธีนี้ประหยัด เนื่องจากไม่ต้องใช้ canister แต่วิธีแช่โดยตรงดังกล่าวไม่ดี เนื่องจากหลอดแก้วหรือฝาเกลียวพลาสติดอาจแตกหรือมีรอยรั่ว หากมีการบรรจุเซลล์ไม่ถูกวิธี หรือหมุนเกลียวแน่น นอกจากนี้ ถ้ามีไนโตรเจนเหลวเล็ดรอดเข้าไปสะสมอยู่ภายในหลอดเก็บเซลล์ดังกล่าว อาจก่อให้เกิดการระเบิดในระหว่างการละลายได้ ดังนั้นจึงนิยมเก็บเซลล์ในไอไนโตรเจนเหลวมากกว่า

การละลายเซลล์มีหลักในการปฏิบัติง่าย ๆ โดยละลายน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว และไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงที่มีวงจรควบคุมการละลาย อาจทำโดยการจุ่มหลอดเซลล์แช่แข็งในอ่างน้ำอุ่น ที่อุณหภูมิ 37 – 40 องศาเซลเซียส พร้อมกับกวนเบา ๆ เพื่อให้น้ำแข็งละลายหมดภายในระยะเวลา 1 – 5 นาที เซลล์บางตัวอาจเกิดการบวมและแตกของเซลล์ในระหว่างกระบวนการทำให้ละลายจาก osmotic shock จึงแก้ไขโดยค่อย ๆ ใส่อาหาร ไม่ให้แรงดันออสโมติคเปลี่ยนแปลงมาก และถ่ายเลี้ยงสู่อาหารใหม่ได้ การทำขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็วและเบามือ และควรกำจัด cryoprotectant ออก โดยการล้างเซลล์ด้วยอาหาร หรือใช้สารละลายน้ำตาลที่มีจำนวนโมลเท่ากับ cryoprotecttant ก่อนถ่ายสู่อาหารเลี้ยงเซลล์

2.6.4.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็งเซลล์

1) Cryoprotectants ที่นิยมใช้มีหลายชนิด เช่น glycerol และ DMSO โดยมักจะใช้ความเข้มข้น 5 – 10 เปอร์เซ็นต์ของอาหารสมบูรณ์

2) Freezing vials มีจำหน่ายทั้งแบบแก้วโบโลซิลิเคท และพลาสติก แบบแก้วมีราคาถูกกว่าแต่ต้องมีการฝึกหัดวิธีการใช้ให้ถูกวิธีเพื่อป้องกันการรั่ว ส่วนพลาสติกมีราคาแพงกว่า โดยมี 2 แบบให้เลือก คือ แบบมีวงแหวน (gasket) และไม่มีวงแหวน แบบมีวงแหวนอาจก่อให้เกิดการรั่วได้ หากหมุนเกลียวแน่นไปอาจทำให้วงแหวนเสียรูป จึงควรเลือกใช้แบบไม่มีวงแหวนมากกว่า

3) อุปกรณ์แช่แข็ง การแช่แข็งโดยวิธีประหยัดทำโดย ใส่หลอดเก็บเซลล์ในกล่องโฟม (styrofoam) แล้วแช่ในตู้แช่แข็ง – 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 – 5 ชั่วโมง ก่อนถ่ายย้ายไปเก็บที่ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว วิธีนี้อาจมีข้อเสีย คือ ต้องมีการทดลองหาสภาวะเหมาะสมซึ่งไม่สามารถควบคุมสภาวะแช่แข็งดังกล่าวในกล่องโฟมได้ อีกวิธีหนึ่ง คือการใช้ตู้แช่แข็งอัตโนมัติที่มีการออกแบบให้แช่แข็งเซลล์ ด้วยอัตราความเร็ว 1 องศาเซลเซียสต่อนาที หรือการแช่หลอดเก็บเซลล์ในถังที่บรรจุ isopropyl alcohol ที่แช่ในตู้แช่แข็ง – 70 องศาเซลเซียส โดยแช่หลอดเป็นเวลานาน 4 – 5 ชั่วโมง ก่อนถ่ายไปเก็บในถังแช่แข็งไนโตรเจนเหลว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) ตู้แช่เก็บเซลล์ หรือถังไนโตรเจนเหลว ใช้เก็บเซลล์เป็นระยะเวลานาน ๆ ได้ ตู้หรือถังมีหลายขนาดที่เก็บหลอดเซลล์ คือ เก็บได้ตั้งแต่ 4,000 หลอด ถึง 33,000 หลอด ซึ่งถ้ามีหลอดเซลล์จำนวนมาก สามารถเก็บโดยการใช้กล่องและใส่เก็บเป็นชั้น ๆ (multi-drawer tessellating racks) แต่ถ้าหากมีจำนวนหลอดเก็บเซลล์น้อย อาจเก็บโดยการยึดหลอดเก็บเซลล์เข้ากับแท่งอลูมิเนียม แล้วบรรจุลงใน canister ของถังไนโตรเจนเหลว การเลือกใช้ตู้แช่เก็บเซลล์ หรือถังไนโตรเจนเหลวขนาดใด ขึ้นอยู่กับความพอใจของผู้ใช้ โดยทั่วไปแบบขนาดใหญ่ให้ความสะดวกสบายในการใช้มากกว่า แต่ต้องใช้ไนโตรเจนเหลวปริมาณมาก เนื่องจากมีช่องเปิดกว้างทำให้ไนโตรเจนเหลวระเหยออกได้ง่าย

2.7 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ กัลยาณี (2550)

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นวิธีการใช้เซลล์หลาย ๆ ชนิดไปทดสอบกับสาร แล้ววัดความมีชีวิตหลาย ๆ วิธี เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ ซึ่งมักนำไปประยุกต์ใช้ในงานคัดกรอง (screening) หาสารที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์ทำลายเซลล์มะเร็งจากสารตัวอย่างหลาย ๆ ชนิด หรือประเมินความปลอดภัยของสารที่เป็นองค์ประกอบต่าง ๆ ในยา เครื่องสำอาง สารปรุงแต่งอาหาร ยาฆ่าแมลง สารเคมีทางอุตสาหกรรม และสารเคมีปนเปื้อนในสภาพแวดล้อมได้ เดิมการตรวจสอบความเป็นพิษของสารเหล่านั้นสามารถทำกับสิ่งมีชีวิตหรือเซลล์สัตว์ แต่ปัจจุบันเซลล์สัตว์เป็นแบบจำลองที่เริ่มเป็นที่นิยมใช้มากขึ้นแทนสัตว์ทดลอง ทำให้การประเมินความเป็นพิษของสารทำได้รวดเร็วและสูญเสียค่าใช้จ่ายในการพัฒนายาหรือผลิตภัณฑ์ลดลง การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงมีการใช้กันมากในงานทดสอบการรักษาโรคมะเร็งทางเคมี หรือมะเร็งเคมีบำบัด (cancer chemotherapy) และใช้ในงานวิเคราะห์ความปลอดภับของสารเคมีต่าง ๆ ต่อเซลล์ หรือสารในสภาพแวดล้อม รวมทั้งใช้ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารเคมีในด้านการเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) การเกิดมะเร็ง (carcinogenicity) การเกิดความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) และการเกิดควาเมป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) ได้

2.7.1 ความเป็นพิษต่อเซลล์

ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) เป็นเหตุการณ์ที่ซับซ้อน และมีหลายปัจจัยเกี่ยวข้อง ดังนั้นในการวิเคราะห์ความเป็นพิษด้วยเซลล์สัตว์ จึงต้องทราบข้อมูลพื้นฐาน เช่น คุณสมบัติของสารขณะสัมผัสกับเซลล์ทดสอบ กลไกการเปลี่ยนแปลงของสารในร่างกาย หรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษ ชนิด และปริมาณของเซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมาย ความเข้มข้นของสาร และระยะเวลาสัมผัสจริงในธรรมชาติ ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ใกล้เคียงกับสภาวะความเป็นสิ่งมีชีวิต และได้ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ที่มีความน่าเชื่อถือ และเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ได้ โดยวิธีวิเคราะห์ควรมีลักษณะดังนี้ คือ

1) ระบบวิธีวิเคราะห์ต้องให้กราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนอง ต่อปริมาณสารทดสอบ (dose response curve) ที่เป็นผลซ้ำของการวิเคราะห์ (reproducible) โดยข้อมูลจากผลซ้ำควรมีความแตกต่างกันน้อยมากในช่วงความเข้มข้นที่ศึกษา

2) ช่วงวิกฤตที่เลือกต่อการตอบสนอง (selected response criterion) ต้องมีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงกับจำนวนเซลล์

3) ข้อมูลที่ได้จาก กราฟความสัมพันธ์ของการตอบสนองต่อปริมาณสารทดสอบต้องมีความสอดคล้อง และสามารถทำนายผลของสารทดสอบชนิดเดียวกันในสัตว์ทดลองได้

ด้วยเหตุนี้ การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์จึงต้องเลือกชนิดเซลล์ไลน์ที่นำมาทดสอบให้เหมาะสม และควรเป็นเซลล์เป้าหมายอย่างแท้จริง เนื่องจากเซลล์ต่างชนิดกันอาจตอบสนองแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ไม่เหมือนกัน อีกทั้งระดับความเป็นพิษอาจแตกต่างกัน เช่น เซลล์อาจถูกทำให้ตาย หรือถูกทำให้มีเมตาโบลิซึมเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นในการวิเคราะห์หายาต้านมะเร็งจะเป็นการหายาที่ทำลายเซลล์มะเร็งให้ตายโดยไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ ส่วนการวิเคราะห์สารอื่น ๆ อาจต้องการผลให้มีการเปลี่ยนแปลงเมตาโบลิซึมของเซลล์เท่านั้น ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์จึงต้องเป็นวิธีที่สะท้อนให้ผลที่ต้องการได้ถูกต้อง อย่างไรก็ตามลักษณะความเป็นพิษที่แตกต่างกัน อาจมีกลไกการออกฤทธิ์ และให้ผลของฤทธิ์ยาแตกต่างกัน จึงต้องมีวิธีที่แตกต่างกันในการศึกษา โดยจุดยุติ (end point) ของแต่ละวิธีเป็นค่าที่บอกระดับความเสียหายที่เกิดกับเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบ และวิธีการวัดที่จุดยุติในการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์มีหลายวิธี เช่น 1) การวัดสีเคมีด้วย crystal violets หรือ sulphorhodamine ที่จะจำเพาะกับองค์ประกอบของเซลล์ด้วยการวัดองค์ประกอบที่เหลือของเซลล์หลังการบ่มกับสารทดสอบ 2) การวัดองค์ประกอบของเซลล์ที่หลั่งออกมาหลังการบ่มกับสารทดสอบ เช่น การตรวจหาปริมาณเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) 3) การวัดกิจกรรมเมตาโบลิซึมของเซลล์ ด้วยการวัดการลดลงของสีจากการใช้เกลือ tetrazolium เช่น [4,5-dimethyl(thiazol-2-yl)-3,5-diphenyl] tetrazolium bromide (MTT); 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2*H*-tetrazolium, inner salt (MTS) และ sodium 2,3-bis [2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]- 2*H*-tetrazolium-5-carbocanilid, inner salt (XTT) 4) วัดการหลั่งให้สารรังสีที่ใส่ให้เซลล์ก่อนบ่มกับสารทดสอบ ซึ่งมีการหลั่งเนื่องจากการแตกของเซลล์ 5) การวัดดีเอนเอที่เสียหายหลังการบ่มกับสารทดสอบที่มีผลต่อพันธุกรรมด้วยวิธี micromucleus assay หรือใช้ flow cytometer เป็นต้น โดยทั่วไปวิธีวัดการแบ่งตัวของเซลล์ เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่าวิธีการวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมตาโบลิซึม และวิธีการวัดการสูญเสียหน้าที่ของเมมเบรน ตามลำดับ ตัวอย่างเช่น ค่าการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอนเอของเซลล์ fibroblast ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่าต่ำกว่าค่าการหลั่งให้ LDH ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นต้น ดังนั้นจุดยุติจึงใช้บอกสถานะของเซลล์ที่ศึกษาแต่ค่า จึงมีความหมาย หรือผลกระทบต่อเซลล์ไม่เหมือนกัน ซึ่งควรพิจารณาเลือกให้ให้เหมาะสมในการระบุบอกความเป็นพิษของสารนั้น ๆ ได้ถูกต้อง

2.7.1.1 ประโยชน์และข้อจำกัด

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงมีประโยชน์ คือ ทำให้สามารถควบคุมสภาพแวดล้อมที่ทำการวิเคราะห์ได้ เช่น ความเข้มข้นของสารพิษ และระยะเวลาที่สัมผัสกับสารพิษ ซึ่งในเซลล์เพาะเลี้ยงสามารถควบคุมได้แม่นยำมากกว่าในสัตว์ทดลอง (แม้ว่าสารทดสอบบางตัวอาจมีความไม่เสถียร) เนื่องจากในสัตว์ทดลองมีระบบหมุนเวียนระบบขับถ่ายกำจัดสารพิษ หรือสารทดสอบจึงทำให้การควบคุมปัจจัยที่ศึกษาได้ยาก และให้ผลทดลองเหมือนเดิมได้เมื่อทำซ้ำ ส่วนการเก็บตัวอย่างจากสัตว์เพื่อศึกษาไม่สามารถทำได้สม่ำเสมอ เช่น ปริมาณเลือดอาจไม่เพียงพอ หรือสภาวะทางกายภาพของสัตว์ทดลองไม่เหมาะสมต่อการเก็บตัวอย่าง โดยการตรวจสอบความเป็นพิษด้วยเซลล์สัตว์ยังมีประโยชน์อื่นอีก คือ 1) เกิดความคุ้มทุนจากการทดสอบเมื่อใช้เซลล์สัตว์ ซึ่งมีความประหยัดมากกว่าการใช้สัตว์ทดลอง 2) การทดลองความเป็นพิษในสัตว์ทดลองมีข้อจำกัด อันเนื่องมาจากเมตาโบลิซึมในคนและสัตว์ ทดลองมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันน้อย และในสัตว์แต่ละสายพันธุ์ (species) ก็ยังมีความแตกต่างกันมาก ทำให้ข้อมูลผลการวิเคราะห์ที่ได้จากสัตว์ทดลองมีความแตกต่างจากในคน และไม่สามารถนำผลข้อมูลไปประยุกต์ใช้ได้ดี และ 3) ทำให้การใช้สัตว์ทดลองลดลง ดังนั้นการใช้ระบบเพาะเลี้ยงในการทดสอบความเป็นพิษจึงสามารถใช้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ชัดเจน ใช้สารทดสอบและเวลาน้อย สามารถทำได้ง่าย ประหยัดสารและเวลา และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับงานทดสอบสารปริมาณมาก ๆ หรือสารหลาย ๆ ชนิดได้ (large scale screening)

2.7.1.2 วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์

การวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์ จะเกี่ยวข้องกับวิธีการที่เซลล์สัมผัสสารทดสอบ ระยะเวลาการสัมผัสสาร และความเสถียรของสารทดสอบ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้กำหนดจุดยุติในการทดสอบ โดยความเป็นพิษจะระบุจากการวัดค่าจุดยุติเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จาก positive control และ negative control วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) ประเภทที่ให้ผลกับสารทดลองอย่างฉับพลัน หรือมีการตอบสนองต่อสารทดสอบภายในระยะเวลาสั้น ๆ เช่น มีการตอบสนองภายในระยะเวลา 5 นาที – 48 ชั่วโมง (immediate or short term response) การวิเคราะห์ความเป็นพิษประเภทนี้มักนิยมใช้วิธีการตรวจสอบความมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเซลล์หลังการบ่มในการระบุถึงความเป็นพิษ หรือใช้ความมีชีวิตหรือไม่มีชีวิตเกี่ยวข้องกับเมม เบรนของเซลล์เป็นจุดยุติ อาจวัดจากการหลังออกของ neutral red หรือการตายของเซลล์ด้วย trypan blue และ 2) ประเภทที่ให้ผลการตอบสนองกับสารทดสอบภายในระยะเวลานานกว่า เช่น ระยะเวลานาน 4 – 7 วัน (long term assay) การวิเคราะห์นี้สามารถทำโดยวัดความสามารถเจริญเป็นโคโลนีของเซล์ หรือวัดเมตาโบลิซึมของเซลล์เป็นจุดยุติได้ อย่างไรก็ตามระยะการสัมผัสสารทดสอบในสิ่งมีชีวิตมักจะสั้นน้อยกว่า 30 นาที เช่น ตาจะหลั่งน้ำตาเพื่อขับสารทดสอบออกในระยะเวลาสั้น ๆ ดังนั้นการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์ตา หรือเซลล์เยื่อบุควรใช้เวลาสัมผัสสารนานน้อยกว่า 30 นาที เป็นต้น

1) Short-Term Assays เป็นวิธีที่นิยมใช้วัดสัดส่วนความมีชีวิตของเซลล์หลังผ่านกระบวนการ ซึ่งอาจก่อการบาดเจ็บกับเซลล์ เช่น การบดแยกเซลล์ในการทำเซลล์ปฐมภูมิ และการละลายเซลล์แช่แข็ง วิธีนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับเซลล์ได้ทุกชนิดในการวิเคราะห์หาตัวยาที่ออกฤทธิ์ เช่น เซลล์จากเนื้อเยื่อมะเร็งที่ผ่าตัดออกจากคนไข้ ก็สามารถใช้วิธีนี้ในการวิเคราะห์ได้เช่นกัน เนื่องจากการทดสอบโดยวิธีนี้ไม่ต้องการการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้เกิดการเจริญ ดังนั้นความสามารถเจริญของเซลล์จึงไม่ใช่ข้อจำกัด และปัญหาการเกิดการคัดเลือกโคลน (clone) ก็ลดลง วิธีการทดสอบนี้จึงสะดวก ทำได้ง่าย และให้ผลเร็ว โดยการตรวจดูผลของสารทดสอบที่ทำลายเซลล์เมมเบรนซึ่งใช้ในการบ่งบอกความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีวิเคราะห์ที่ใช้ตรวจสภาพการเป็นเนื้อเดียว (integrity) ของเซลล์เมมเบรน มีทั้ง dye inclusion และ dye exclusion สีที่นิยมใช้กันมากในการทำ dye exclusion test คือ trypan blue ซึ่งเซลล์มีชีวิตสามารถป้องกันไม่ให้สีเข้าไปภายในเซลล์ เซลล์ตายจึงติดสีฟ้าของ trypan blue วิธีนี้สามารถบอกความมีชีวิตของเซลล์ในขณะที่ทำการวิเคราะห์อยู่เท่านั้น เพราะเป็นการตรวจสอบดูความสมบูรณ์ของเมมเบรน ซึ่งอาจทำให้ผลการประเมินความมีชีวิตผิดพลาดได้ เนื่องจากอาจมีการทำลายที่ทำให้เซลล์ตายเกิดขึ้นภายหลังกับเซลล์ที่ผ่านการตรวจว่า “มีชีวิต” แล้วได้ นอกจากนี้ยังไม่สามารถตรวจสอบผลของสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์แบบผันกลับได้ (reversibility) หรือสารทดสอบที่ออกฤทธิ์ช้าหรือใช้เวลานาน (delayed cytotoxicity)

2) Long-Term Assay สารพิษหรือสารทดสอบบางชนิดไม่ได้มีฤทธิ์ทำให้เซลล์ตาย แต่อาจเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเซลล์ หรือรบกวนวงจรเซลล์ (cell cycle) ซึ่งไปมีผลให้รูปแบบการเจริญของเซลล์ผิดไป ผลที่เกิดเช่นนี้สามารถบ่งบอกได้ โดยดูการเปลี่ยนแปลงเกี่ยวกับการหายใจ (respiration) การเกิดไกลโคไลซิส (glycolysis) การออกฤทธิ์ของเอนไซม์ (enzyme activity) วงจรเซลล์ ความสามารถในการสร้างโคโลนี และผลของดีเอนเอ หรือพันธุกรรม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสิ่งเหล่านี้ในเซลล์สามารถใช้บ่งบอกการตอบสนองของเซลล์ต่อสารพิษได้ การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจความอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) มักทำได้ค่อนข้างยาก แต่ถ้าหากเหรียบเทียบความอยู่รอดเป็นความสามารถสร้างโคโลนีของเซลล์ ก็อาจใช้วิธี colony forming efficiency เป็นวิธิวิเคราะห์ได้ โดยเฉพาะเมื่อเซลล์เพาะเลี้ยงนั้นสามารถแบ่งตัวต่อได้อีกอย่างน้อง 2 – 3 ครั้งหลังจากที่นำสารทดสอบออกไป ดังนั้น long – term assay จึงเป็นวิธีที่วัดผลของสารพิษในระยะยาว ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถวิเคราะห์การออกฤทธิ์ของสารแบบผันกลับ และใช้บ่งบอกถึงความสามารถฟื้นกลับคืนได้ของเซลล์ โดยการวัดความสามารถเจริญ และการเกิดเมตาโบลิซึมของประชากรเซลล์ทั้งหมด

หลักการ MTT – Based Cytotoxicity Assay

เซลล์ที่มีการเจริญในช่วงการแบ่งตัวทวีคูณ มีความเหมาะสมในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ช่วงระยะเวลาที่เซลล์สัมผัสสารพิษ คือ เวลาที่ทำให้เกิดการทำลายสูงสุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเสถียรของสาร หลังจากนำสารทดสอบออกจะปล่อยให้เซลล์มีการเจริญ แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์โดยใส่อาหารที่มี MTT ในแต่ละหลุม แล้วบ่มในที่มืด เพื่อให้เกิดความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและมีความสามารถเจริญ กับเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตและไม่สามารถเจริญ จำนวนเซลล์ที่รอดสามารถบอกโดยวิธีอ้อมจากการลดลงของ MTT ซึ่งคือปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้น และเมื่อละลายในตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น DMSO ก็จะสามารถวัดปริมาณสีได้โดยสเปกโตรมิเตอร์ อย่างไรก็ตาม สารทดสอบใดที่มีผลให้มีเอนไซม์ succinate dehydrogenase หรือ mitochondria dehydrogenase มีฤทธิ์มากจะทำให้มีสีเกิดขึ้นมากเช่นกัน ดังนั้นสารทดสอบบางตัวหากมีคุณสมบัติเป็น surfactant อาจทำให้สารตั้งต้นเข้าสู่เซลล์มากโดยเซลล์ไม่แตก ซึ่งจะมีผลให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธีวิเคราะห์นี้สูงเกินจริงได้

3) Metabolic Test ความแตกต่างระหว่าง metabolic test และ survival test คือ survival test เป็นการตรวจหาจำนวนเซลล์ และกิจกรรมของเซลล์ (cellular activity) ที่ยังหลงเหลือหลังจากการรับสารเป็นช่วงระยะเวลาสั้น หรือระยะเวลานาน แล้วให้เซลล์ฟื้นตัวในที่ไม่มีสารทดสอบเป็นระยะเวลานานพอสมควร สิ่งที่วัดได้จึงเป็นความสามารถอยู่รอดของเซลล์ที่ยังคงความสามารถแบ่งตัวต่อไป ส่วน metabolic test เป็นวิธีที่การวัดผลของสารทดสอบต่อวิถีเมตาโบลิซึม ซึ่งควรวัดทันที หรือภายใน 24 ชั่วโมงแรกที่ทดสอบกับสาร และผลที่ได้จะเป็นเมตาโบลิซึมของเซลล์ต่อสารทดสอบ วิธีวิเคราะห์เมตาโบลิซึมมีหลายวิธี ตั้งแต่วิธีง่าย ๆ โดยการสังเกตการยับยั้งการลดลงของพีเอชจนถึงวิธีที่ต้องใช้สารติดตาม หรือการตรวจหาฤทธิ์เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ของเซลล์ ซึ่งอาจใช้เวลาทดสอบสั้น ๆ (ประมาณ 30 นาที หรือมากกว่า) หรือระยะเวลาทดสอบเป็นเวลาหลายวัน นอกจากนี้ควรตระหนักว่าหากต้องการวัดผลของฤทธิ์สารต่อเมตาโบลิซึม จะต้องทำการวิเคราะห์ในที่มีสารทดสอบ และหากต้องการศึกษาผลต่อการรอดของเซลล์แบบไม่ผันกลับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(irreversible effect) และผันกลับได้จะต้องทำการวิเคราะห์โดยเลี้ยงเซลล์ต่อในที่ที่ไม่มีสารทดสอบด้วย ซึ่งหากเซลล์มีหน้าที่ปกติหลังการทดสอบนาน 48 ชั่วโมง จะใช้บอกการฟื้นตัวของเซลล์ หรือการผันกลับได้ โดยเซลล์ที่ไม่ตาย และฟื้นตัวได้จะสามารถสร้างเอนไซม์ต่อไป

2.8 สารสำคัญในพืชสมุนไพร รัตนา (2547)

พืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคมีมากมายหลายชนิด และกระจัดกระจายอยู่ทั่วไป คุณภาพของพืชสมุนไพรจะดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง เช่น สภาวะแวดล้อมในการปลูก ฤดูกาล และช่วงเวลาที่เก็บสมุนไพร เป็นต้น ในยาสมุนไพรแต่ละชนิดประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิด บางชนิดมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacological action) ซึ่งมักเรียกว่าเป็นสารสำคัญ (active constituents) สามารถนำมาใช้เป็นยา นอกจากนี้ยังใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร และเครื่องสำอางค์ สารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายชนิด ซึ่งอาจแบ่งเป็นกลุ่มใหญ่ได้ 7 กลุ่ม ดังนี้

2.8.1 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate)

เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน โดยไฮโดรเจน และออกซิเจนมักจะพบในสัดส่วน 2 : 1 เป็นกลุ่มสารที่พบได้ทั้งในพืช และสัตว์ คาร์โบไฮเดรตในพืชสร้างขึ้นจากการสังเคราะห์แสง และเก็บสะสมไว้ ซึ่งจะถูกนำมาใช้เป็นอาหารของคนและสัตว์ คาร์โบไฮเดรต และอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรที่นำมาใช้ประ- โยชน์ในทางเภสัชกรรม

2.8.2 ไขมัน (lipids)

เป็นเอสเทอร์ (ester) ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาว (long chain fatty acid) จับกับแอลกอฮอล์ (alcohol) นำมาใช้เป็นอาหาร หรือใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม

2.8.3 น้ำมันหอมระเหย (volatile oils หรือ essential oils หรือ ethereal oils)

พบได้ในส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง เป็นต้น มีลักษณะเป็นน้ำมันที่มีกลิ่น และรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายที่อุณหภูมิธรรมดา ไม่มีสี แต่เมื่อตั้งทิ้งไว้นาน ๆ อาจถูกออกซิไดซ์ (oxidized) ทำให้สีเข้มขึ้น จึงต้องเก็บไว้ในขวดสีชาที่ปิดสนิท น้ำมันหอมระเหยประกอบด้วยส่วนประกอบทางเคมีซึ่งซับซ้อน อาจจำแนกน้ำมันหอมระเหยตามชนิดขององค์ประกอบได้หลายกลุ่ม ดังนี้

1) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกไฮโดรคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลัก
2) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกแอลกอฮอล์เป็นองค์ประกอบหลัก
3) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกอัลดีไฮด์เป็นองค์ประกอบหลัก
4) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกคีโทนเป็นองค์ประกอบหลัก
5) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลเป็นองค์ประกอบหลัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกฟีนอลิกอีเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก

7) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกออกไซด์เป็นองค์ประกอบหลัก

8) น้ำมันหอมระเหยที่มีสารจำพวกเอสเทอร์เป็นองค์ประกอบหลัก

2.8.4 เรซิน และบาลซัม (resins และ balsams)

สารในกลุ่มนี้ประกอบด้วยเรซิน และสารประกอบที่มีเรซินเป็นองค์ประกอบ เช่น โอเลโอเรซิน (oleoresins) โอเลกัมเรซิน (oleo-gum-resins) และบาลซัม (balsams) เป็นต้น

2.8.5 แอลคาลอยด์ (alkaloids)

เป็นสารประกอบกลุ่มใหญ่มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง ที่ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง พบมาในพืชชั้นสูง เป็นสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบ (organic nitrogen compounds) คุณสมบัติทั่วไปของแอลคาลอยด์ คือ มักมีรสขม มีฤทธิ์เป็นด่าง ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) มีคุณสมบัติทางเคมี ทางกายภาพ และฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาต่อมนุษย์ และสัตว์แตกต่างกันมาก

1) มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย เช่น ควินิน (quinine)

2) มีฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น อะโทรพีน (atropine)

3) ใช้ต้านมะเร็ง (antitumor) เช่น วินบลาสทนซัลเฟต (vinblastine sulfate) และวินคริสทีนซัลเฟต (vincristein sulfate)

4) ฤทธิ์ระงับอาการปวด (analgesic) เช่น มอร์ฟีน (morphine)

5) ฤทธิ์ระงับอาการไอ เช่น โคดีอีน (codeine)

6) ฤทธิ์ลดความดันโลหิต เช่น เรสเซอฟีน (reserpine)

7) ฤทธิ์ขยายหลอดลม (bronchodilator) เช่น (theophylline)

8) ฤทธิ์ลดน้ำมูก แก้หวัด เช่น อีฟริดรีน (ephedrine)

2.8.6 ไกลโคไซด์ (glycosides)

เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบ ด้วยส่วอะไกลโคน (aglycone) หรือจีนิน (genin) จับกับน้ำตาล หรืออนุพันธ์ของน้ำตาล จัดเป็นสารกลุ่มใหญ่ที่นำมาใช้ประโยชน์เป็นยารักษาโรค และบางชนิดมีฤทธิ์เป็นสารพิษ

2.8.7 แทนนิน (tannins)

เป็นสารพวกพอลิฟีนอล (polyphenol) มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน แก้ท้องเสีย มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.8 เทอร์พีนอยด์ (terpenoid)

สามารถใช้รักษาโรคมาลาเรีย ความผิดปกติของระบบไหลเวียนของโลหิต ยาต้านมะเร็ง ยาขับปัสสาวะ ลดความดันโลหิต และรักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ เป็นต้น

2.9 การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร รัตนา (2547)

การสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพรทำได้หลายวิธี โดยทั่วไปการสกัดเบื้องต้น ไม่ว่าจะสกัดด้วยวิธีการใด หรือใช้ตัวทำละลายใดก็จะได้องค์ประกอบเป็นของผสมหรือสารสกัดอย่างหยาบ (crude extract) ซึ่งเป็นสิ่งที่สกัดออกมาจากสมุนไพร โดยใช้น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย (solvent) สารสกัดอย่างหยาบนี้เป็นของผสมขององค์ประกอบทางเคมีของสมุนไพร ซึ่งจะมีทั้งองค์ประกอบที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active constituents) ซึ่งมักเรียกว่า สารสำคัญ (active constituents) และองค์ประกอบที่ไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically inactive constituents) ซึ่งเรียกว่า สารเฉื่อย (inert substanccs) ชนิด และสัดส่วนขององค์ประกอบในสารสกัดจะแปรเปลี่ยนไปตามสภาพของสมุนไพรที่ใช้และสภาวะที่ใช้ในการสกัด วัตถุประสงค์ของการสกัดพืชสมุนไพร คือ

- เพื่อสกัดแยกเอาสารสำคัญออกจากสมุนไพร
- เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของสารสำคัญสูง
- เพื่อลดขนาด (dose) ของการใช้สมุนไพรลงให้อยู่ในปริมาณที่เหมาะสม

2.9.1 น้ำยาสกัดหรือตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัด ได้แก่ น้ำ แอลกอฮอล์ (alcohol) หรือสารละลายผสมของสารละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ นอกจากนี้อาจใช้กรด - ด่างเติมลงในน้ำยาสกัดเพื่อปรับความเป็นกรด – ด่างของน้ำยาสกัดให้เหมาะสมยิ่งขึ้น ส่วนสารละลายชนิดอื่น ๆ เช่น อีเทอร์ (ether) คลอโรฟอร์ม (chloroform) มีใช้บ้างเฉพาะกรณี

2.9.1.1 น้ำ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดี หาง่าย และราคาถูก แต่การใช้น้ำอย่างเดียวเป็นตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรมีข้อเสียหลายประการ คือ สามารถละลายองค์ประกอบที่ไม่ต้องการออกมาได้มาก เช่นเดียวกับสารสำคัญที่ต้องการ สารเฉื่อยที่ละลายออกมากับน้ำ เช่น น้ำตาล แป้ง ล้วนเป็นอาหารที่ดีของเชื้อจุลินทรีย์ จึงทำให้เกิดการบูดเสียของสารสกัดเนื่องจากจุลินทรีย์ได้ถ้าไม่ใส่สารกันบูด (preservation) นอกจากนี้น้ำระเหยได้ที่อุณหภูมิสูง ถ้าต้องการทำให้สารสกัดในน้ำเข้มข้นจะต้องใช้อุณหภูมิสูงในการระเหยไล่น้ำออกไป ซึ่งอาจเกิดความเสียหายกับสารสำคัญได้ ดังนั้นจึงไม่ค่อยนิยมใช้น้ำเดี่ยว ๆ เป็นน้ำยาสกัด แต่ใช้ร่วมกับตัวทำละลายอื่น ๆ เช่น แอลกอฮอล์ หรือกรด หากเติมกรดเล็กน้อยลงในน้ำ (acidified water) ใช้สกัดองค์ประกอบสำคัญในพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมุนไพรที่มีองค์ประกอบสำคัญเป็นสารประกอบแอลคาลอยด์ ส่วนน้ำที่เติมด่างลงไปเล็กน้อย (alkanised water) จะใช้สกัดสมุนไพรบางชนิด เช่น เปลือกคาคารา (Cascara bark) เป็นต้น

2.9.1.2 แอลกอฮอล์ จัดเป็นตัวทำละลายที่ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำ แอลกอฮอล์มีข้อดีกว่า ดังนี้

1) มีความจำเพาะ (selectivity) ในการละลายมากกว่าน้ำ
2) มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
3) หากต้องการทำให้สารสกัดเข้มข้นจะระเหยได้ง่าย แต่ราคาของแอลกอฮอล์จะแพงกว่าน้ำ

2.9.1.3 น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ (hydroalcoholic mixture) เป็นน้ำยาที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถละลายสารสำคัญในพืชสมุนไพรได้ใกล้เคียงกับแอลกอฮอล์ แต่ราคาถูกกว่า และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้อีกด้วย นอกจากนี้การใช้น้ำยาผสมแอลกอฮอล์ยังช่วยป้องกันการแยกตัวของสารต่าง ๆ ในสารสกัดเมื่อตั้งทิ้งไว้ ซึ่งมักเกิดในกรณีที่ใช้น้ำยาอย่างเดียวในการสกัด

นอกจากน้ำยาสกัดต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น ตัวทำละลายอินทรีย์ก็อาจใช้ในการสกัดพืชสมุนไพรได้ เช่น เฮกเซน (hexane) และปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ใช้สกัดพืชสมุนไพรในขั้นต้น เพื่อขจัดสารพวกไขมันออกไปก่อนที่จะทำการสกัดสารสำคัญ แต่ต้องระเหยเอาน้ำยาสกัดเหล่านี้ออกไปจนหมดก่อนทำการสกัดขั้นตอนต่อไป ตัวทำละลายเหล่านี้นิยมใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non polar component) เช่น ไขมัน (lipids) สเตียรอยด์ (steroids) เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) เป็นต้น

คลอโรฟอร์ม และอีเทอร์จัดเป็นตัวทำละลายที่มีขั้ว (polarity) ปานกลาง ใช้สกัดองค์ประกอบที่ไม่มีขั้ว (non-polar component) ไปจนถึงสารที่มีขั้วปานกลาง

เมทานอล (methanol) เป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดสารสำคัญที่มีขั้ว (polar active constituent) เช่นเดียวกับแอลกอฮอล์ แต่นิยมใช้แอลกอฮอล์มากกว่า เพราะราคาถูกกว่า และมีความเป็นพิษน้อยกว่า

2.9.2 วิธีการสกัด

2.9.2.1 มาเซอเรชัน (maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีการหมักสมุนไพรกับน้ำยาสกัดจนกระทั่งเนื้อเยื่อของสมุนไพรอ่อนนุ่ม และน้ำยาสกัดสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในผงสมุนไพรออกมาได้

การหมักสมุนไพรควรทำในภาชนะที่มีฝาปิดสนิทในน้ำยาสกัดที่เหมาะสม จะทำเป็นเวลานาน 7 วัน หรือตามกำหนดในเภสัชตำรับ หรือจนกระทั่งองค์ประกอบที่ต้องการละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกมาหมด ในระหว่างที่หมักผงสมุนไพรอยู่นั้น ควรเขย่าหรือคนเป็นครั้งคราว เพื่อเพิ่มอัตราเร็วของการสกัด เมื่อครบกำหนดเวลาจึงกรองแยกกาก (marc) ออกจากน้ำยาสกัด วิธีการสกัดนี้เหมาะสมกับพืชสมุนไพรที่มีโครงสร้าง หรือเนื้อเยื่อที่ไม่แข็งแรงมากนัก เช่น ใบ ดอก ซึ่งทำให้อ่อนนุ่มได้ง่าย จัดเป็นวิธีที่ใช้น้ำยาสกัดน้อย จึงประหยัด และเนื่องจากเป็นวิธีการที่ไม่ใช้ความร้อน จึงเหมาะสมกับสารสกัดที่ไม่ทนต่อความร้อน แต่วิธีการสกัดนี้มักจะไม่สมบูรณ์ เนื่องจากไม่ค่อยมีการเคลื่อนที่ของน้ำยาสกัด เมื่อสารในสมุนไพรละลายออกมาถึงระดับหนึ่งจะเกิดความสมดุลขององค์ประกอบภายในสมุนไพร และน้ำยาสกัดที่ใช้ ทำให้อัตราเร็วของการสกัดชะงักลง จึงไม่เหมาะที่จะใช้สกัดในกรณีที่ต้องการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพรจนสมบูรณ์

เนื่องจากวิธีการสกัดแบบมาเซอเรชันใช้เวลานาน จึงมีผู้ดัดแปลงใช้มิกเซอร์ (mixer) หรือโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer, รูปที่ 2.8) มาช่วยทำให้เซลล์พืชแตกออกก่อนทำการสกัด เพื่อย่นระยะเวลาการสกัด ต่อมาพัฒนาใช้เสียงที่มีความถี่สูงเกิน 20,000 เฮิรตซ์ ร่วมในการสกัด เรียกวิธีนี้ว่า การสกัดอัลตราซาวน์ (ultrasound extraction) แต่วิธีการสกัดอัลตราซาวน์อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของน้ำไปเป็นเพอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งอาจมีผลต่อการสกัด นอกจากนี้อาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ต่อสารโดยตรง เพราะขณะที่ใช้สารสกัดอัตราซาวน์ทำให้เกิดช่องว่าง และมีอากาศแทรกเข้าไปในตัวทำละลาย

2.9.2.2 เพอร์โคเลชัน (percolation) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชสมุนไพร โดยการปล่อยให้น้ำยาสกัดไหลผ่านผงสมุนไพรอย่างช้า ๆ พร้อมกับละลายเอาองค์ประกอบออกจากผงสมุนไพรออกมา โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า เพอร์โคเลเตอร์ (percolator) ดังรูปที่ 2.9

รูปที่ 2.8 Homogenizer (http://eoffice.wu.ac.th)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.9 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีเพอร์โคเลชัน (http://ecoserve.net)

2.9.2.3 การสกัดแบบต่อเนื่อง (continuous extraction) ดังรูปที่ 2.10

รูปที่ 2.10 การสกัดสารจากพืชแบบต่อเนื่องโดยวิธีการสกัดด้วย soxhlet extractor (http://aicstanford.edu)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.3 การเลือกวิธีการสกัด

การสกัดสารสำคัญในพืชสมุนไพรมีหลายวิธี ซึ่งวิธีการสกัดที่ดีที่สุดสำหรับพืชสมุนไพรแต่ละชนิด มักได้จากการทดลองขั้นต้น โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นกับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่

2.9.3.1 ธรรมชาติของพืชสมุนไพร โดยพิจารณาจาก

1) ลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจสกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน หากเป็นสมุนไพรที่มีเนื้อแข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชัน หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

2) ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่าย นิยมใช้วิธีตัวดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จะจำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชัน หรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

3) ความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อนควรใช้วิธีมาเซอเรชัน หรือเพอร์โคเลชัน

2.9.3.2 คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในสารสกัด หากต้องการสารสกัดที่ไม่ใช่สารสำคัญ และมีคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งกลิ่น สี รส ของยาเตรียมต่าง ๆก็อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่ไม่ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมด เปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่ากับการลงทุนหรือไม่

2.9.4 การทำสารสกัดให้เข้มข้น (concentration)

สารสกัดอย่างหยาบที่ได้จะมีประมาตรมาก และเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวก และไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้เข้มข้นเสียก่อนด้วยวิธีต่าง ๆ ดังนี้

2.9.4.1 การระเหย (free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยใช้ความร้อนหม้ออังไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสารสกัดสลายตัวได้ เนื่องจากอุณภูมิสูงเกินไป และหากใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในการสกัด การระเหยโดยให้ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย

2.9.4.2 การกลั่นในสภาวะสุญญากาศ (distillation in vacuo) จัดเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมทั้งลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศโดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวา-โพเรเตอร์ (rotary evaporator) ดังรูปที่ 2.11 ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่จะกลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์ หรือส่วนควบแน่นไอ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุอยู่ในภาชนะจะแช่อยู่ในหม้ออังไอน้ำที่ควบคุมอุณภูมิได้ และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อให้มีการกระจายความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้จะต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับ โดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศ สารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์ และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่น ซึ่งสารละลายดังกล่าวสามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์ และนำกลับมาใช้ใหม่ได้

2.9.4.3 การทำให้แห้ง (drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้ง ได้สารสกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็ง มีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือการใช้ความร้อน (spray dryer) ฯลฯ

2.9.4.4 อัลตราฟิลเทรชั่น (ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้น โดยใช้แผ่นเมมเบรน กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000

รูปที่ 2.11 โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

3.1.1 เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1.1 เซลล์ไลน์ L929

3.1.1.2 เซลล์ไลน์ P388

3.1.2 วัสดุอุปกรณ์

3.1.2.1 ใบพญาวานร

3.1.2.2 ตู้อบลมร้อน

3.1.2.3 ถาด

3.1.2.4 เครื่องปั่น

3.1.2.5 ผ้าขาวบาง

3.1.2.6 ขวดดูแรน

3.1.2.7 เครื่องกรองแบบลดความดัน

3.1.2.8 กระดาษกรองเบอร์ 1

3.1.2.9 กระดาษฟรอยด์

3.1.2.10 ขวดสีชา

3.1.2.11 เครื่องระเหยแบบหมุน

3.1.2.12 ผ้าก๊อซ

3.1.2.13 สำลี

3.1.2.14 ปิเปตแก้วขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.1.2.15 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3.1.2.16 ตู้ปลอดเชื้อ

3.1.2.17 ออโตปิเปต

3.1.2.18 ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดพลาสติกขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตรเมตร

3.1.2.19 กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ

3.1.2.20 กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted

3.1.2.21 เครื่องปั่นเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.2.22 หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 10 มิลลิลิตร

3.1.2.23 ขวดดูแรนขนาด 100 250 และ 1000 มิลลิลิตร

3.1.2.24 ทิปขนาดต่าง ๆ

3.1.2.25 ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2.26 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (96-well plate)

3.1.2.27 มัลติเปิลแชนแนล

3.1.2.28 ไมโครเพลท รีดเดอร์

3.1.3 สารเคมี

3.1.3.1 เฮกเซน (hexane)

3.1.3.2 ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane)

3.1.3.3 เอทานอล (ethanol)

3.1.3.4 แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

3.1.3.5 Phosphate Buffer Saline (PBS)

3.1.3.6 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

3.1.3.7 Roswell Park Memorial Institue (RPMI 1640)

3.1.3.8 Fetal bovine serum (FBS)

3.1.3.9 Trypsin 0.25 เปอร์เซ็นต์ (การเตรียมในภาคผนวก ก)

3.1.3.10 Freezing media (การเตรียมในภาคผนวก ก)

3.1.3.11 Gentamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.1.3.12 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (การเตรียมในภาคผนวก ก)

3.1.3.13 Organic solvent (ethanol: DMSO ในอัตราส่วน 1: 1)

3.1.3.14 Trypan blue (การเตรียมในภาคผนวก ก)

3.2 การเตรียมสารสกัดจากพญาวานร

สกัดสารจากต้นพญาวานรโดยใช้วิธีการสกัดแบบหมักด้วยสารสกัด 3 ชนิด คือ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล เริ่มจากนำใบของต้นพญาวานรมาล้างให้สะอาด จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียสจนแห้งสนิท (นำออกมาชั่งทุกวันจนน้ำหนักคงที่) เป็นระยะเวลา 3-4 วัน จากนั้นนำใบของต้นพญาวานรที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้มีขนาดเล็กลง บรรจุลงในถุงผ้าขาวบางที่เตรียมไว้ นำไปใส่ลงในโหลแก้วที่เติม เฮกเซน ด้วยอัตราส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1: 10 คือใช้พญาวานร 30 กรัม ต่อเฮกเซน 300 มิลลิลิตร แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบ 7 วัน นำถุงผ้าขาวบางออกมาจากโหลแก้วแล้วสะเด็ดน้ำ จากนั้นทำการย้ายพญาวานรที่อยู่ในผ้าขาวบางไปใส่ในขวดโหลที่มี ไดคลอโรมีเทน 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 7 วัน จากนั้นทำพญาวานรที่อยู่ในผ้าขาวบางให้สะเด็ดน้ำและย้ายลงสู่ขวดโหลที่มี เอทานอล 300 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อได้สารสกัดจากพญาวานรครบทั้ง 3 ชนิด (เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล) แล้วนำสารละลายที่มีสารสกัดจากพญาวานรทั้ง 3 ชนิดไปกรองด้วยเครื่องกรองแบบลดความดัน โดยใช้กระดาษกรอง whatman เบอร์ 1 เพื่อนำไปแยกตัวทำละลายออกและทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) แล้วนำมาใส่ในขวดสีชา เก็บไว้ที่ ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยสารสกัดที่ได้นั้นสามารถนำไปใช้ทดสอบกับเซลล์ซึ่งจะกล่าวถึงในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

3.3.1 การ subculture เซลล์ไลน์ L929

ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ (การเตรียมในภาคผนวก ก) ใน ฟลาสก์ ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นจะต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อการคงอยู่ของเซลล์และต้องทำการ subculture เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ อายุของเซลล์ และทำให้เซลล์มีการเจริญต่อไปได้ ซึ่งการ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติ 2 แบบ โดยแบบที่ 1 คือ นำเซลล์ไลน์ L929 ที่เลี้ยงอยู่ในฟลาสก์มาดูดอาหารเก่าทิ้ง และใส่ PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างทำความสะอาดเซลล์ 2 – 3 ครั้ง แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 วินาที เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ แล้วใช้มือเคาะขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะจนหมด เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะแล้วทำการเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วแบ่งเป็น 2 ฟลาสก์ใหม่ ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตรและเติมอาหาร ในแต่ละฟลาสก์ ให้ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ส่วนแบบที่ 2 คือ นำเซลล์ไลน์ L929 ที่เลี้ยงอยู่ในฟลาสก์มาดูดอาหารเก่าทิ้ง และใส่ PBS ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เพื่อล้างทำความสะอาดเซลล์ 2 – 3 ครั้ง แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 30 วินาที เพื่อให้เซลล์เริ่มหลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ แล้วใช้มือเคาะภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะจนหมด เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะแล้วทำการเติมอาหาร ปริมาตร 3 มิลลิลิตรโดยไม่มีการเปลี่ยนฟลาสก์ และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จำนวนเซลล์จนได้เซลล์ที่แข็งแรงมีสุขภาพดีจึงทำการย้ายสู่ 96-well plate เพื่อนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดจากต้นพญาวานรต่อไป

3.3.2 การทำ cryopreservation เซลล์ไลน์ L929

นำเซลล์เซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในฟลาสก์มาทำการ subculture เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะหมดแล้ว ทำการเติมอาหาร ปริมาตร 3-4 มิลลิลิตร แล้วทำการดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และละลายเซลล์ที่ตกตะกอนด้วยอาหารที่ผสม DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ (freezing media) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการอยู่รอดเมื่อถูกแช่แข็ง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปใส่ใน cryopreservation tube แล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลง โดยนำไปเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.3 การศึกษากราฟการเจริญ (Growth curve) ของเซลล์ไลน์ L929

นำเซลล์ไลน์ L929 ที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ในฟลาสก์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาทำการ subculture (ข้อ 3.3.1) จากนั้นดูดเซลล์ที่แขวนลอยออกมาทำการนับเซลล์ และคำนวณเซลล์ที่มีอยู่ในฟลาสก์ (ภาคผนวก ก) และทำการปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิลิตร จำนวน 28 จานเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตั้งต้นเท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการนับจำนวนเซลล์หลังจากปลูกเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 14 วัน โดยนับจำนวน 2 จานเพาะเลี้ยงต่อ 1 วัน วิธีการนับจำนวนเซลล์เริ่มจากดูดอาหารเก่าออกจากจานเพาะเลี้ยง แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะจนหมด ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และละลายเซลล์ที่ตกตะกอนด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทำการนับเซลล์ และคำนวณเซลล์ที่ได้ บันทึกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละจานเพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาแสดงในรูปของกราฟการเจริญของเซลล์ และคำนวณหาค่าของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Population doubling time, PDT) จากสูตรในภาคผนวก ก

3.4 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388

3.4.1 การ subculture เซลล์ไลน์

ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์เฉพาะที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์แขวนลอย (การเตรียมในภาคผนวก ก) ในขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเซลล์จะต้องทำการเปลี่ยนถ่ายอาหารเพื่อการคงอยู่ของเซลล์และต้องทำการ subculture เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ อายุของเซลล์ การ subculture ต้องนำเซลล์ไลน์ P388 ที่เลี้ยงอยู่ในฟลาสก์ ดูดเซลล์ทั้งหมดใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 10 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนของอาหารเก่าทิ้ง จากนั้นเติมอาหารใหม่ลงไป 3 มิลลิลิตร ผสมกับเซลล์ที่ตกตะกอนอยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงให้เข้ากัน แล้วแบ่งเป็น 2 ฟลาสก์ใหม่ ฟลาสก์ละ 1.5 มิลลิลิตรและเติมอาหาร ในแต่ละฟลาสก์ ให้ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์จนได้เซลล์ที่แข็งแรงจึงทำการย้ายสู่ 96-well plate เพื่อนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดจากต้นพญาวานรต่อไป

3.4.2 การทำ cryopreservation เซลล์ไลน์ P388

นำเซลล์เซลล์ไลน์ P388 ที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในฟลาสก์ซึ่งเป็นเซลล์แบบแขวนลอยมาทำการดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และละลายเซลล์ที่ตกตะกอนด้วย freezing media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปใส่ใน cryopreservation tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงโดยนำไปเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.3 การศึกษากราฟการเจริญ (Growth curve) ของเซลล์ไลน์ P388

นำเซลล์ไลน์ P388 ที่ได้เพาะเลี้ยงไว้ในฟลาสก์ขนาด 25 ลูกบาศก์เซนติเมตร มาทำการดูดพ่นเซลล์เพื่อให้เซลล์แขวนลอยที่เกาะกันอยู่แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดียวๆ จากนั้นดูดเซลล์ออกมาทำการนับเซลล์ และคำนวณเซลล์ที่มีอยู่ในฟลาสก์ (ภาคผนวก ก) และทำการปลูกเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิลิตร จำนวน 14 จานเพาะเลี้ยง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตั้งต้นเท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตรทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อ 1 จานเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก) นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการนับจำนวนเซลล์หลังจากปลูกเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน โดยนับจำนวน 2 จานเพาะเลี้ยงต่อ 1 วัน วิธีการนับจำนวนเซลล์เริ่มจากดูดพ่นเซลล์ให้เซลล์ที่เกาะหลุดออกจากกัน ทำการนับเซลล์ และคำนวณเซลล์ที่ได้ บันทึกจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละจานเพาะเลี้ยง นำข้อมูลที่ได้มาแสดงในรูปของกราฟการเจริญของเซลล์ และคำนวณหาค่าของจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Population doubling time, PDT) จากสูตรในภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดพญาวานร

3.5.1 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ L929 ด้วยวิธี MTT

3.5.1.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 ลงใน 96-well plate

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 โดยการปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 200 ไมโครลิตร ($1x10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96 - well plate หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.1.2 การเตรียมสารละลายจากพญาวานรที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.5.1.2.1 ใส่ DMSO ลงในสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด (เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล) ในอัตราส่วน 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DMSO

3.5.1.2.2 ผสมสารละลายพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ FBS ในอัตราส่วนความเข้มข้นเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นกรอง ขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.5.1.2.3 เตรียมสารสกัดจากพญาวานรที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.375, 0.75, 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมของ 96 - well plate ตำแหน่งของการใส่สารดังรูปที่ 3.1 หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

3.5.1.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เตรียมสารละลาย MTT โดยละลายผง MTT ใน PBS โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียมในภาคผนวก ก) เทสารสกัดจากพญาวานรที่ผสมกับอาหารออกจากหลุมให้หมด แล้วเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี 5 เปอร์เซ็นต์ FBS ลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำ 96-well plate หุ้มด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มจน 3 ชั่วโมง นำ 96-well plate ออกจากตู้บ่ม แล้วเทอาหารที่มีสารละลาย MTT ออกอย่างรวดเร็ว โดยการคว่ำ 96-well plate ลงบนกระดาษซับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเติมสารละลายอินทรีย์ (DMSO : ethanol ในอัตราส่วน 1 : 1) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้ละลายผลึกฟอร์มาซานสีม่วงให้อยู่ในรูปสารละลาย แล้วนำไปเขย่าในเครื่องไม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

H1	**H2**	**H3**	**H4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
H1	**H2**	**H3**	**H4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
H1	**H2**	**H3**	**H4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
H1	**H2**	**H3**	**H4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
H1	**H2**	**H3**	**H4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
H1	**H2**	**H3**	**H4**	**D1**	**D2**	**D3**	**D4**	**E1**	**E2**	**E3**	**E4**
C	**C**	**C**	**C**	**C**	**C**	**C +2**	**C +2**	**C +2**	**C +2**	**C +2**	**C +2**
B	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**	**B**

รูปที่ 3.1 แผนผังการทดลองการใส่สารสกัดจากพญาวานร ใน 96-well plate

B : Blank (ไม่เติมสารใดๆ)

C : Control (เติมเฉพาะอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ แต่ไม่มีสารสกัด)

C+2 : Control+ 2% DMSO (เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ผสม 2 เปอร์เซ็นต์ DMSO)

H1-H4 : เติมสารสกัดพญาวานรจากเฮกเซนที่ความเข้มข้น 3, 1.5, 0.75 และ 0.375 mg/ml ตามลำดับ

D1-D4 : เติมสารสกัดพญาวานรจากไดคลอโรมีเทนที่ความเข้มข้น 3, 1.5, 0.75 และ 0.375 mg/ml ตามลำดับ

E1-E4 : เติมสารสกัดพญาวานรจากเอทานอลที่ความเข้มข้น 3, 1.5, 0.75 และ 0.375 mg/ml ตามลำดับ

3.5.1.4 การวิเคราะห์ผลของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ L929

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารที่ต้องการทดสอบ x 100}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ควบคุม}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ P388 ด้วยวิธี MTT

3.5.2.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 ลงใน 96-well plate

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 โดยการปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 100 ไมโครลิตร ($1x10^4$ เซลล์ต่อหลุม) ลงใน 96- well plate หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.2.2 การเตรียมสารละลายจากพญาวานรที่ความเข้มข้นต่างๆ

3.5.2.2.1 ใส่ DMSO ลงในสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด (เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล) ในอัตราส่วน 150 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของ DMSO

3.5.2.2.2 ผสมสารละลายพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิดลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS ในอัตราส่วนความเข้มข้นเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กรองสารละลายด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.5.2.2.3 เตรียมสารสกัดจากพญาวานรที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.375, 0.75, 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อ 1 หลุมของ 96-well plate ตำแหน่งของการใส่สารดังรูปที่ 3.1 หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

3.5.2.3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

เตรียมสารละลาย MTT โดยละลายผง MTT ใน PBS โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร และนำ 96-well plate หุ้มด้วยกระดาษฟรอยด์เพื่อป้องกันแสง นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบ 3 ชั่วโมง นำ 96-well plate ออกจากตู้บ่ม แล้วดูดสารสกัดจากพญาวานรที่ผสมกับสารละลาย MTT ออกโดยใช้มัลติเปิลแชนแนลด้วยความระมัดระวัง ออกมาหลุมละ 200 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายอินทรีย์ (DMSO : ethanol ในอัตราส่วน 1 : 1) หลุมละ 200 ไมโครลิตร เพื่อใช้ละลายผลึกฟอร์มาซานสีม่วงให้อยู่ในรูปสารละลาย แล้วนำไปเขย่าในเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความเร็วรอบ 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.4 การวิเคราะห์ผลของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ P388

$$\% \text{ การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารที่ต้องการทดสอบ x 100}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ควบคุม}}$$

3.6 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) ซึ่งการวิเคราะห์จะใช้โปรแกรม SPSS 14.0 (Statistical package for the social sciences) ในการวิเคราะห์ทางสถิติที่ ($p < 0.05$) และทำการเปรียบเทียบเชิงซ้อนรายคู่ (Multiple Comparison) เพื่อค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันของตัวอย่างด้วยพิสัยดันแคน (Duncan' s New Multiple Range Procedure) ด้วยโปรแกรม MINITAB

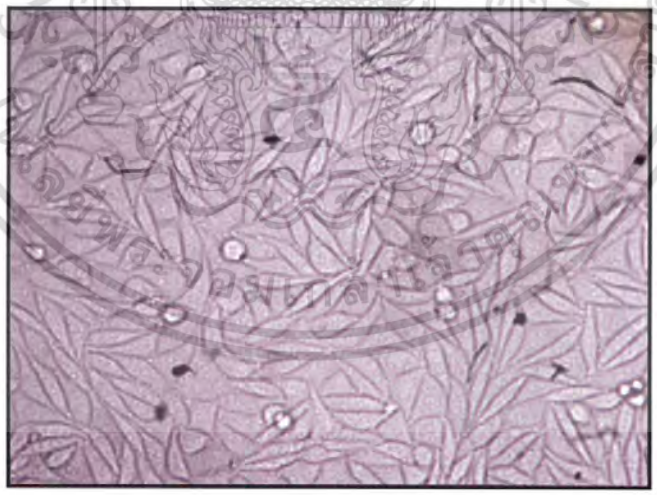
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

4.1.1 การ subculture

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 เป็นเซลล์แบบเกาะผิว ดังรูปที่ 4.1 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน เซลล์จะมีอายุมากขึ้นและตายในที่สุด จึงต้องมีการ subculture เพื่อเป็นการเพิ่มอายุของเซลล์ และเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ให้สร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมา การ subculture เป็นการชักนำให้เซลล์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวหลุดออกจากภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้เอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำลายพันธะโปรตีนที่ยึดเกาะกับพื้นผิวภาชนะ โดยเซลล์ที่มีลักษณะเป็นไฟโบรบลาสต์จะหดสั้นจนมีลักษณะกลม หลังจากนั้นเซลล์จะยึดเกาะกับพื้นผิวใหม่และเกิดการแบ่งเซลล์ต่อไปจนเต็มพื้นผิว



รูปที่ 4.1 ลักษณะของเซลล์ไลน์ L929 ที่เกาะพื้นผิวแล้ว ที่กำลังขยาย 100 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

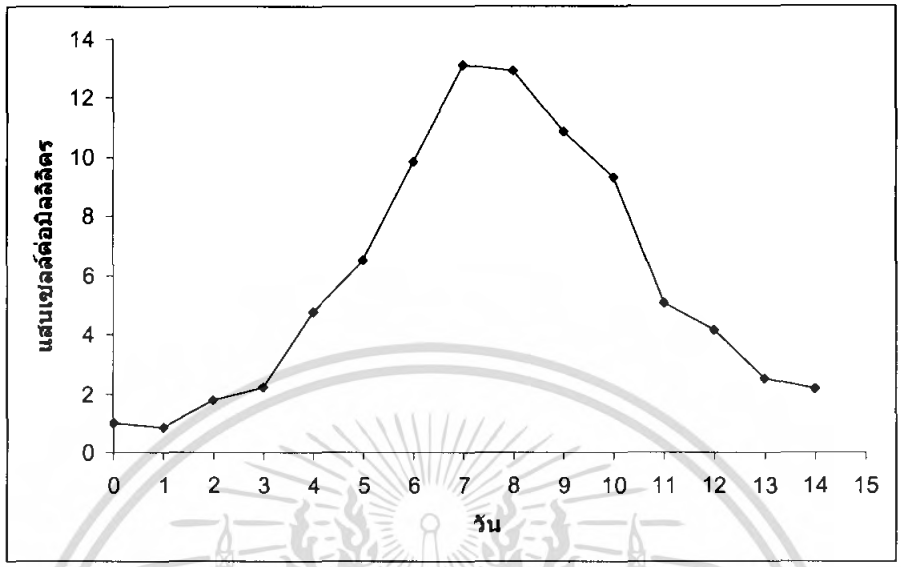
4.1.2 การศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ L929

จากการศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ L929 รูปที่ 4.2 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ปริมาตรเซลล์เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 วัน โดยทำการนับจำนวนเซลล์ทุกวัน วันละ 2 ซ้ำ โดยนับจำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตในแต่ละวันแสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 14 วัน

วันที่นับจำนวนเซลล์	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)		ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
0	1.000	1.000	1.000
1	0.912	0.863	0.888
2	1.700	1.905	1.803
3	2.145	2.325	2.235
4	4.900	4.675	4.788
5	5.775	7.275	6.525
6	9.550	10.100	9.825
7	13.425	12.850	13.138
8	13.825	12.050	12.94
9	10.550	11.125	10.838
10	9.673	8.958	9.316
11	4.475	5.648	5.062
12	3.528	4.740	4.134
13	2.546	2.445	2.496
14	2.314	1.984	2.149

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ที่ passage 98 เป็นระยะเวลา 14 วัน

จากตารางที่ 4.1 สามารถคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Population doubling time, PDT) จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Population doubling time (PDT)} = \frac{(t - t_0)\log 2}{(\log N - \log N_0)}$$

t_0 = เวลาที่นับจำนวนเซลล์ตั้งต้น (ชั่วโมงที่ 0 หรือ วันที่ 0)

t = เวลาที่เซลล์มีจำนวนสูงสุด ในที่นี้คือชั่วโมงที่ 168 (วันที่ 7)

$N_0 = 1 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($\log N_0 = 5$)

$N = 13.138 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($\log N = 6.118$)

แทนค่า

$$PDT = \frac{(168 - 0)(3.01)}{(6.118 - 5)}$$

$$PDT = \frac{55.814}{1.118}$$

PDT = 49.92 ชั่วโมงต่อการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

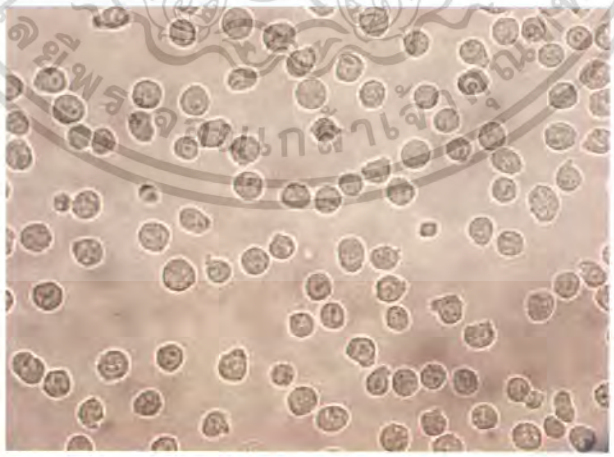
จากค่า PDT ที่คำนวณได้นั้นสามารถบอกได้ว่า เซลล์ไลน์ L929 นั้นมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็น 2 เท่า ภายในเวลา 49.92 ชั่วโมง หรือประมาณ 2 วัน ฉะนั้นจึงควรทำการ subculture เซลล์ไลน์ L929 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปได้ 3-4 วัน

โดยค่า PDT ที่ได้คือ 49.92 ชั่วโมงนั้นมีความแตกต่างจากการทดลองของ คณิสส์ และคณะ (2548) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสะเดาสกัดที่มีผลต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เพาะเลี้ยงของหนู (L929) โดยใช้อาหาร DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ ในการเพาะเลี้ยง รายงานว่าค่า PDT ของเซลล์ไลน์ L929 มีค่าเท่ากับ 24 ชั่วโมง และทำการ subculture เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปได้ 2-3 วัน

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388

4.2.1 การ subculture

การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 เป็นเซลล์แบบแขวนลอย ดังรูปที่ 4.3 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลานาน เซลล์จะแบ่งตัวเพิ่มมากขึ้น และตายในที่สุด เนื่องจากขาดอาหาร จึงต้องมีการเปลี่ยนถ่ายอาหารหรือการถ่ายเลี้ยงเซลล์ไปสู่ภาชนะเลี้ยงใหม่ (subculture) เพื่อให้มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม และเป็นการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ให้สร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาใหม่ การเปลี่ยนถ่ายอาหารสามารถทำได้ง่ายเพียงดูดเซลล์ออกจากภาชนะที่ใช้เลี้ยงให้เหลือเซลล์เพียง 0.5-1 มิลลิลิตร แล้วเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่ใส่ลงไป 3 มิลลิลิตร ระยะเวลาในการเปลี่ยนถ่ายอาหารประมาณ 3 วันต่อครั้ง



รูปที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์ไลน์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์แขวนลอย ที่กำลังขยาย 200 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

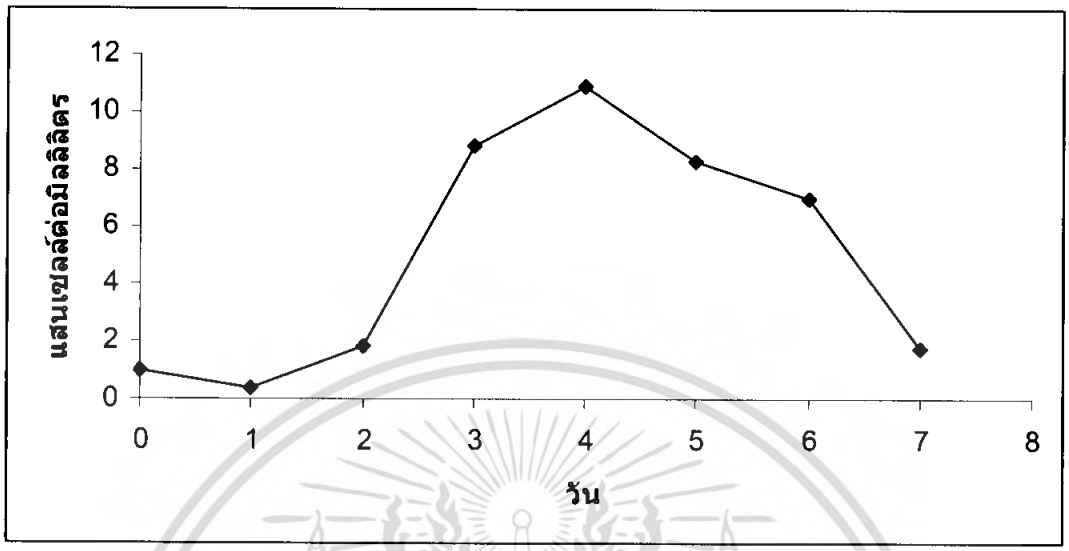
4.2.2 การศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ P388

จากการศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ของเซลล์ไลน์ P388 รูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหาร RPMI ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ซึ่งใช้ปริมาตรเซลล์เท่ากับ 2 มิลลิลิตรต่อจานเพาะเลี้ยง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน โดยทำการนับจำนวนเซลล์ทุกวัน วันละ 2 ซ้ำ โดยใช้สีย้อมทริปแพนบลู จำนวนเซลล์ที่เจริญเติบโตในแต่ละวันแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จำนวนเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ในระยะเวลา 7 วัน

วันที่นับจำนวนเซลล์	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)		ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร ($x10^5$)
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	
0	1.000	1.000	1.000
1	0.360	0.408	0.384
2	2.004	1.680	1.842
3	8.760	8.880	8.820
4	12.456	9.444	10.950
5	8.496	8.052	8.274
6	7.160	6.900	7.030
7	1.670	1.891	1.781

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ P388 เป็นระยะเวลา 7 วัน

จากตารางที่ 4.2 สามารถคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า (Population doubling time, PDT) จากสูตรต่อไปนี้

$$\text{Population doubling time (PDT)} = \frac{(t - t_0)\log 2}{(\log N - \log N_0)}$$

t_0 = เวลาที่นับจำนวนเซลล์ตั้งต้น (ชั่วโมงที่ 0 หรือ วันที่ 0)

t = เวลาที่เซลล์มีจำนวนสูงสุด ในที่นี้คือชั่วโมงที่ 96 (วันที่ 4)

N_0= 1 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($\log N_0 = 5$)

N = 10.950 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($\log N = 6.039$)

แทนค่า

$$\text{PDT} = \frac{(96 - 0)(3.01)}{(6.039 - 5)}$$

$$\text{PDT} = \frac{31.894}{1.039}$$

PDT = 30.70 ชั่วโมงต่อการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากค่า PDT ที่คำนวณได้นั้นสามารถบอกได้ว่า เซลล์ไลน์ P388 นั้นมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็น 2 เท่า ภายในเวลา 30.70 ชั่วโมง หรือ 1.28 วัน ฉะนั้นจึงควรทำการ subculture เซลล์ไลน์ P388 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปได้ 2-3 วัน ซึ่งค่า PDT ที่ได้มีความแตกต่างจากการทดลองของ Phillip และคณะ (1990) ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 และศึกษาการเจริญเติบโต พบว่าค่า PDT ที่ได้อยู่ในช่วง 14-18 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงในอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์

4.3 การสกัดสารจากพญาวานร

ในการศึกษาการสกัดสารจากพญาวานรพบว่า เมื่อนำใบจักรนารายณ์สดน้ำหนัก 412.79 กรัม มาล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 3 วัน จนได้ใบพญาวานรแห้งน้ำหนัก 34.57 กรัม คงที่ หลังจากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้มีขนาดเล็กลง จะได้ใบพญาวานรบดแห้ง 34.49 กรัม แล้วนำมาสกัดสารออกจากใบพญาวานรโดยการนำใบพญาวานรบดแห้งที่ได้ มาบรรจุลงในถุงผ้าขาวบาง มัดปากถุงแล้วใส่ลงในขวดที่ปิดสนิท แล้วแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ปริมาตร 300 มิลลิลิตรจำนวน 3 ชนิดๆละ 7 วันได้แก่ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.5 จากนั้นจึงนำสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากชั้นของ เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ไปกรองด้วยเครื่องกรองแบบลดความดัน แล้วบรรจุลงในขวดแก้ว หลังจากนั้นนำไปแยกตัวทำละลายออกและทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยการใช้เครื่องระเหยแบบหมุน ดังรูปที่ 4.5 จนได้สารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล อย่างหยาบจากพญาวานร (รูปที่ 4.6) ซึ่งสามารถคำนวณหาผลผลิตของสารสกัดหยาบจากพญาวานรได้ดังตารางที่ 4.3 และเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารสกัดหยาบในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานรเมื่อเทียบกับน้ำหนักสดของพญาวานรจะได้เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 0.18 0.33 และ 0.27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าสารสกัดไดคลอโรมีเทนจากพญาวานรจะได้ผลผลิตออกมามากที่สุด

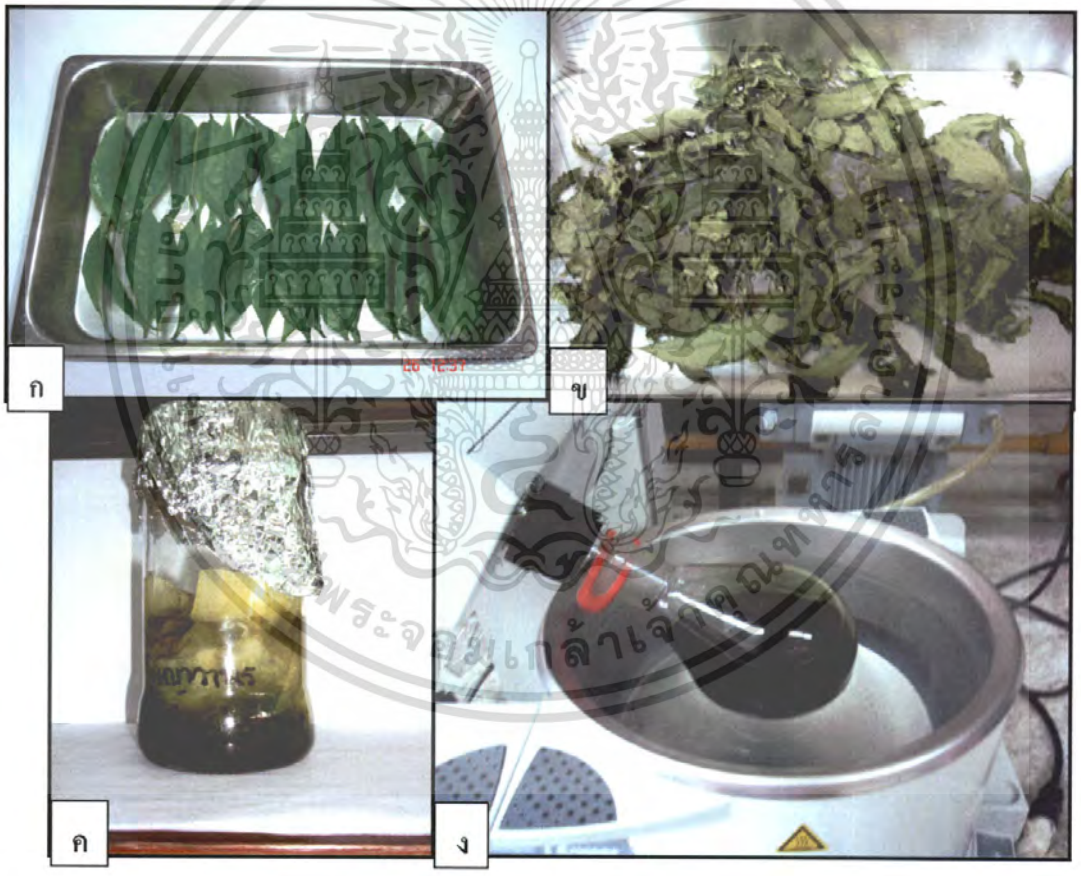
จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่ได้มาทำการเจือจางด้วยอาหาร DMEM ที่มี FBS 5 เปอร์เซ็นต์ (ทดสอบกับเซลล์ไลน์ L929) และเจือจางด้วยอาหาร RPMI 1640 ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ (ทดสอบกับเซลล์ไลน์ P388) ให้ได้ความเข้มข้น 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของอาหารที่มีความเข้มข้นของ DMSO ร้อยละ 2 ดังรูปที่ 4.8 โดยที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะทำการกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรก่อนเจือจางต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลผลิตของสารสกัดหยาบจากพญาวานร

สารสกัดจากพญาวานร	ผลผลิต (น.น./น.น.)
เฮกเซน	0.0018
ไดคลอโรมีเทน	0.0033
เอทานอล	0.0027

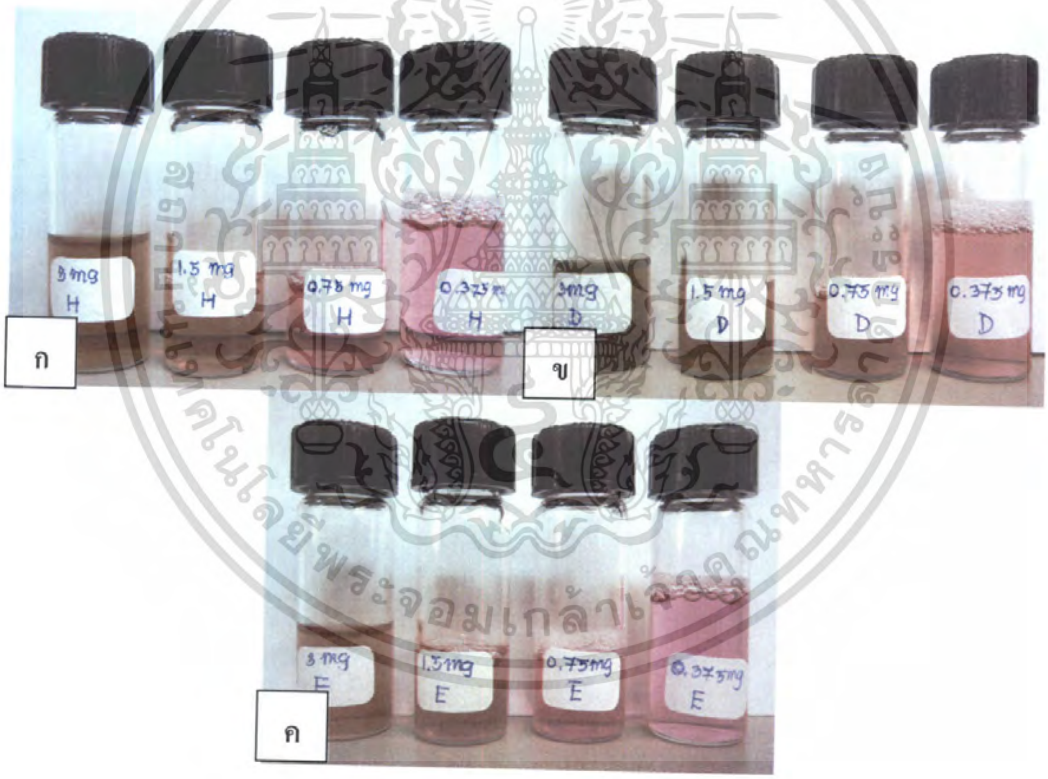
*น้ำหนัก (กรัม) ของสารสกัดหยาบต่อกรัมของน้ำหนักสดของพญาวานร



รูปที่ 4.5 ภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดจากพญาวานร (ก) ใบพญาวานรสด (ข) ใบพญาวานรอบแห้ง (ค) ใบพญาวานรบดแห้งที่แช่ในตัวทำละลายอินทรีย์ (ง) การระเหยสารสกัดจากพญาวานรด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.6 แสดงตัวอย่างสารสกัดหยาบจากพญาวานรที่ได้จากเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล



รูปที่ 4.7 แสดงตัวอย่างความเข้มข้นระดับต่างๆของสารสกัดจากพญาวานร

(ก) สารสกัดเฮกเซน

(ข) สารสกัดไดคลอโรมีเทน

(ค) สารสกัดเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การทดสอบความเป็นพิษของพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ ด้วยวิธี MTT

4.4.1 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดจากพญาวานรต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ด้วยวิธี MTT

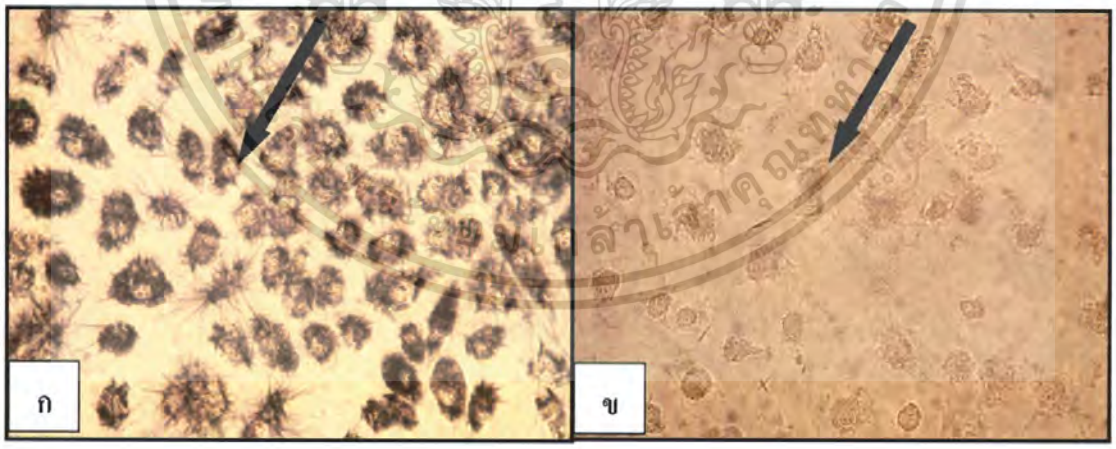
จากการศึกษาผลของสารสกัดพญาวานรที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 พบว่า หลังจากการเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 ใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากพญาวานร) ลงไปแล้วทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารละลาย MTT ลงไป และทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมาทำการล้าง และเติมสารละลายอินทรีย์ (DMSO : ethanol ในอัตราส่วน 1:1) เพื่อทำการละลายผลึกฟอร์มาซาน แล้วนำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกันได้ โดยเซลล์ที่มีชีวิตนั้นจะติดสีม่วงส่วนเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะใสไม่มีสี ดังรูปที่ 4.8 และนำผลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ดังตารางที่ 4.4 และ 4.5

เซลล์ไลน์ L929 ที่ได้รับสารสกัดจากพญาวานรในตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นั้นเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากพญาวานรที่กรองด้วยกระดาษกรอง 0.45 ไมโครเมตร และเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 0 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 ในสารสกัดจากพญาวานรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 4.4 ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้น 0.375 และ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเฮกเซน และไดคลอโรมีเทนมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เช่นเดียวกับสกัดจากเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.375 0.75 และ 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม บ่งบอกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง และความเข้มข้นระดับดังกล่าวมีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ L929 ให้เจริญมากขึ้น ส่วนที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล มีผลทำให้ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับทุกความเข้มข้น แสดงว่าสารสกัดยิ่งมีความเข้มข้นสูงร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ยิ่งมีค่าน้อยลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ไลน์ L929 ที่ได้รับสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโร-มีเทน และ เอทานอล เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 4.5 และที่ความเข้มข้น 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเฮกเซนและไดคลอโรมีเทนมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม (0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) บ่งบอกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ไลน์ L929 ให้เจริญมากขึ้น และที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล มีผลทำให้ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าน้อยที่สุด เมื่อเทียบกับทุกความเข้มข้น แสดงว่าสารสกัดยิ่งความเข้มข้นสูงขึ้นเท่าใด ร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ยิ่งมีค่าน้อยลงเท่านั้น

เมื่อเปรียบเทียบช่วงเวลาในการเติมสารสกัดจากพญาวานรลงไปในเซลล์ L929 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าในแต่ละความเข้มข้นคือ 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงจะมีค่าร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง แสดงว่าเวลามีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ ยิ่งเวลามากขึ้นเซลล์จะมีร้อยละของการมีชีวิตรอดน้อยลง



รูปที่ 4.8 เซลล์ L929 ที่ได้รับการทดสอบด้วยวิธี MTT (ก) เซลล์ L929 ที่มีชีวิต (ข) เซลล์ L929 ที่ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก พญาวานร (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% Cytotoxicity)		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทานอล
0	100.00[c]	100.00[c]	100.00[c]
0.375	169.55[a]	156.70[a]	189.57[a]
0.75	158.66[a]	127.75[b]	165.92[a]
1.5	97.95[c]	51.31[d]	158.85[a]
3	1.96[e]	1.49[e]	3.26[e]

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 4.5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

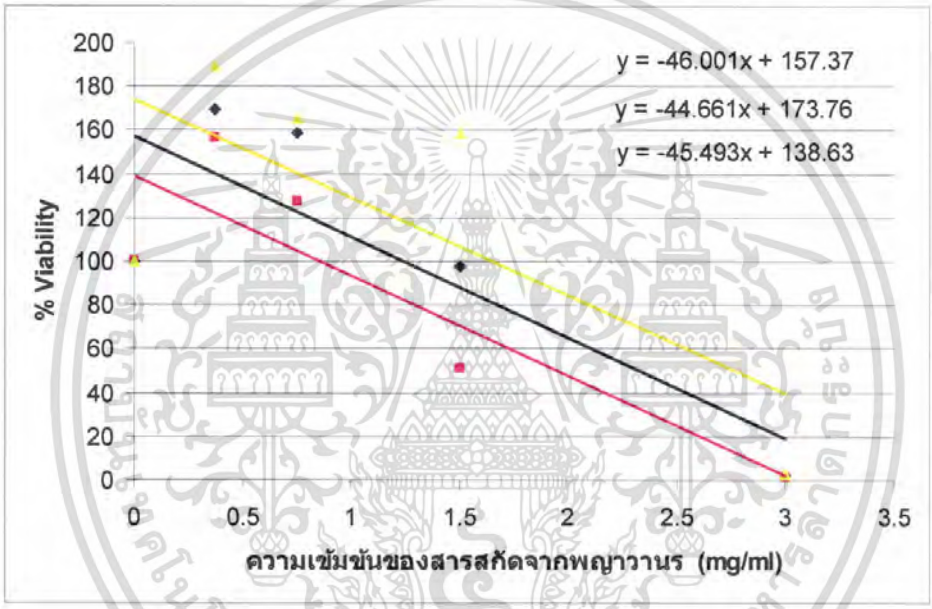
ความเข้มข้นของสารสกัดจาก พญาวานร (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% Cytotoxicity)		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเ ทน	เอทานอล
0	100. 00[a]	100. 00[a]	100. 00[a]
0.375	106.82[a]	116.14[a]	93.04[ab]
0.75	82.65[b]	87.39[ab]	86.59[ab]
1.5	38.75[c]	33.11[c]	82.58[b]
3	1.74[d]	2.16[d]	0.23[d]

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$

จากตารางที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าเมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต จากการทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ในแต่ละความเข้มข้นมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

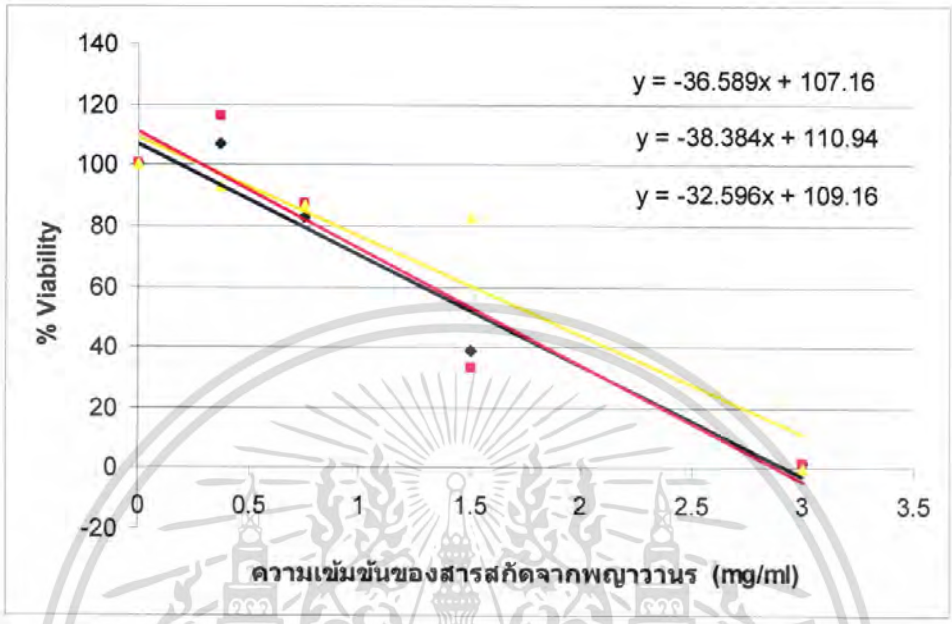
เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงจะได้กราฟดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ ซึ่งกราฟที่ได้สามารถนำไปคำนวณหาค่าการอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ที่ร้อยละ 50 (CC_{50}) เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 100 ได้ และค่า CC_{50} ที่ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 4.6



รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต ที่ 24 ชั่วโมง

* เส้นสีน้ำเงิน คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน
เส้นสีชมพู คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นไดคลอโรมีเทน
เส้นสีเหลือง คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต ที่ 48 ชั่วโมง

* เส้นสีน้ำเงิน คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน
เส้นสีชมพู คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นไดคลอโรมีเทน
เส้นสีเหลือง คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเอทานอล

จากรูปที่ 4.9 และ 4.10 ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานร กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต ลักษณะของกราฟทั้งสองรูปนั้น (รูปที่ 4.9 และ 4.10) บอกถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากพญวานรจะแปรผันตรงกับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิต นั่นคือ ยิ่งความเข้มข้นของสารสกัดจากพญวานรสูงขึ้น ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตยิ่งมากขึ้นตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ที่ร้อยละ 50 (CC_{50}) เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 100 ซึ่งได้จากการคำนวณ

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	50 % Cytotoxicity Concentration (mg/ml)	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
เฮกเซน	2.33	1.56
ไดคลอโรมีเทน	1.95	1.59
เอทานอล	2.77	1.81

4.4.2 การทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity test) ของสารสกัดจากพญาวานรต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ P388 ด้วยวิธี MTT

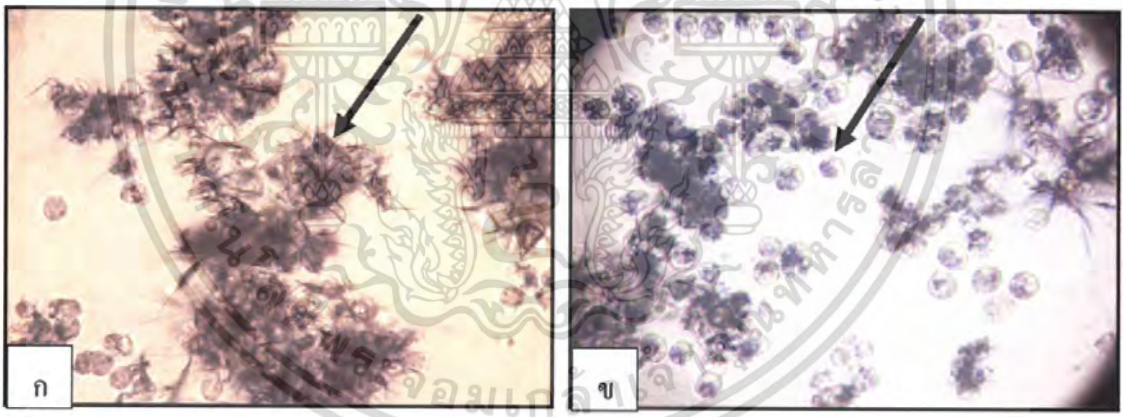
จากการศึกษาผลของสารสกัดพญาวานรที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไลน์ P388 พบว่า หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 ใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ และกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดจากพญาวานร) ลงไปแล้วทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จากนั้นใส่สารละลาย MTT ลงไป และทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบ 3 ชั่วโมงนำสารสกัดพญาวานรที่ผสมอยู่กับสารละลาย MTT ใน 96-well plate ออก และเติมสารละลายอินทรีย์ (DMSO : ethanol ในอัตราส่วน 1 : 1) เพื่อทำการละลายผลึกฟอร์มาซาน แล้วนำไปทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกันได้ โดยเซลล์ที่มีชีวิตนั้นจะติดสีม่วงส่วนเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะใสไม่มีสี ดังรูปที่ 4.11 และนำผลที่ได้ไปคำนวณหาร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงได้ดังตารางที่ 4.7 และ 4.8 ตามลำดับ

เซลล์ไลน์ P388 ที่ได้รับสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอลจากพญาวานรเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงนั้นเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดจากพญาวานรที่กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.375, 0.75, 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ P388 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดจากพญาวานรที่ได้จากตัวทำละลายแต่ละชนิด มีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 4.7 และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเฮกเซนมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์น้อยกว่ากลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควบคุม (0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และสกัดจากไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

เซลล์ไลน์ P388 ที่ได้รับสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และ เอทานอลจากพญาวานร เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเมื่อนำมาวิเคราะห์หาค่าทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันทางสถิติดังตารางที่ 4.8 และพบว่าที่ความเข้มข้น 0.375 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ของสารสกัดจากเฮกเซน และไดคลอโรมีเทนมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนสารสกัดจากเอทานอลที่ความเข้มข้น 0.375 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนความเข้มข้น 0.75 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีร้อยละของการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม



รูปที่ 4.11 เซลล์ P388 ที่ได้รับการทดสอบด้วยวิธี MTT (ก.) เซลล์ P388 ที่มีชีวิต (ข.) เซลล์ P388 ที่ตาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก พญาวานร (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% Cytotoxicity)		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทานอล
0	100.00^{b}	100.00^{b}	100.00^{b}
0.375	99.55^{b}	107.37^{b}	121.48^{a}
0.75	95.71^{b}	95.85^{b}	106.07^{b}
1.5	53.63^{d}	82.13^{c}	92.42^{d}
3	38.43^{e}	47.76^{de}	54.35^{d}

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$

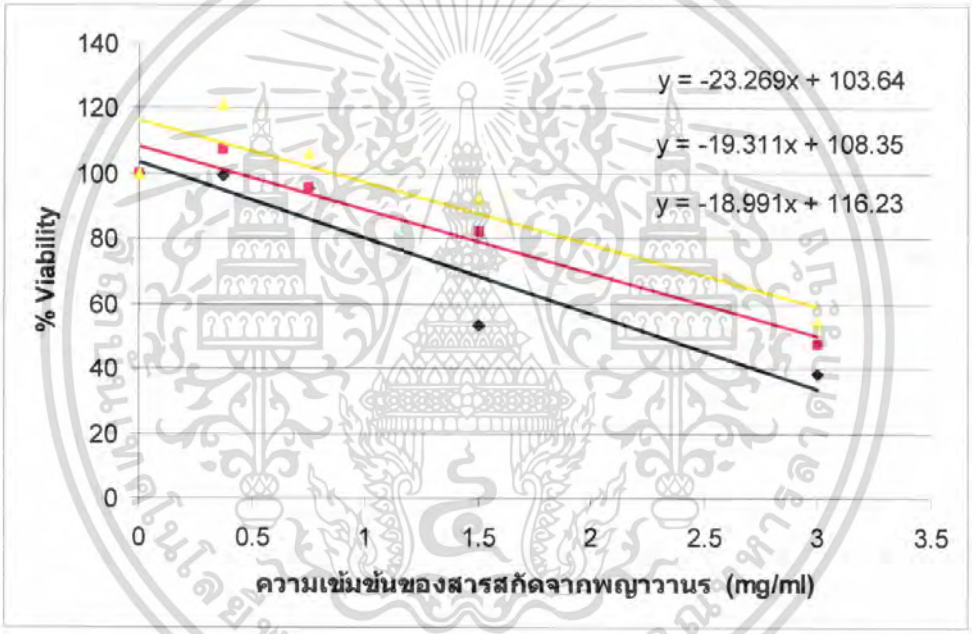
ตารางที่ 4.8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดจาก พญาวานร (mg/ml)	ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต (% Cytotoxicity)		
	เฮกเซน	ไดคลอโรมีเทน	เอทานอล
0	100.00^{bc}	100.00^{bc}	100.00^{bc}
0.375	87.39^{bcd}	88.86^{bcd}	119.67^{a}
0.75	81.14^{cd}	75.46^{cde}	72.17^{def}
1.5	74.06^{cde}	65.40^{ef}	57.78^{fg}
3	27.52^{h}	46.27^{g}	51.21^{fg}

*ตัวอักษรที่แสดงเหนือค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าเหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

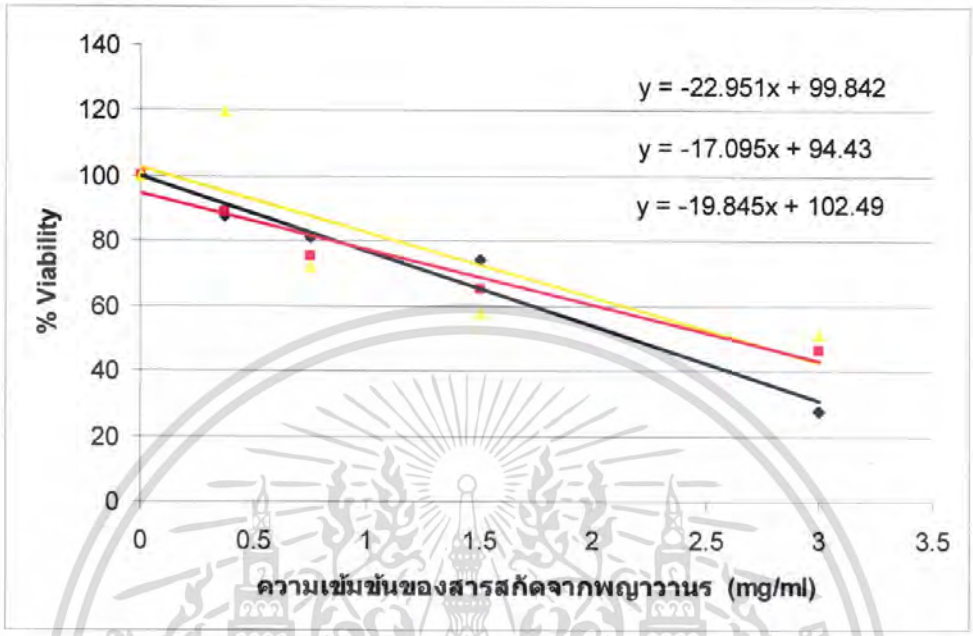
จากตารางที่ 4.7 และ 4.8 พบว่าเมื่อนำค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต จากการทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ในแต่ละความเข้มข้นมาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัด กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงจะได้กราฟดังรูปที่ 4.12 และ 4.13 ตามลำดับ ซึ่งกราฟที่ได้สามารถนำไปคำนวณหาค่าการอยู่รอดของเซลล์ไลน์ P388 ที่ร้อยละ 50 (CC_{50}) เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 100 ได้ และค่า CC_{50} ที่ได้แสดงไว้ดังตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ที่ 24 ชั่วโมง

* เส้นสีน้ำเงิน คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน
เส้นสีชมพู คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นไดคลอโรมีเทน
เส้นสีเหลือง คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ที่ 48 ชั่วโมง

* เส้นสีน้ำเงิน คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเฮกเซน
เส้นสีชมพู คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นไดคลอโรมีเทน
เส้นสีเหลือง คือ สารสกัดจากพญาวานรในชั้นเอทานอล

จากรูปที่ 4.12 และ 4.13 เป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างสารสกัดจากพญาวานร กับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ลักษณะของกราฟทั้งสองรูปนั้น (รูปที่ 4.12 และ 4.13) บอกถึงความเข้มข้นของสารสกัดจากพญาวานรจะแปรผันตรงกับค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิต ยิ่งความเข้มข้นของสารสกัดจากพญาวานรสูงขึ้น ค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตยิ่งมากขึ้นตามไปด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ P388 ที่ร้อยละ 50 (CC_{50}) เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการอยู่รอดร้อยละ 100 ซึ่งได้จากการคำนวณ

ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้สกัด	50 % Cytotoxicity Concentration (mg/ml)	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
เฮกเซน	2.31	2.17
ไดคลอโรมีเทน	3.02	2.60
เอทานอล	3.49	2.64

ในการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง พบว่ายังไม่มีผู้ที่ศึกษาอย่างกว้างขวาง มีเพียงการศึกษาที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพญาวานรซึ่งถือว่าใกล้เคียงที่สุดที่จะสามารถนำมาอภิปรายได้

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง โดยใช้เซลล์ไลน์ P388 ในการทดลองมีความสอดคล้องกับการทดลองของ Siripong และคณะ (1992) ที่ได้ศึกษาสารสกัดเมทานอลจากใบของต้นฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Burm.f.) ที่อยู่ในวงศ์เดียวกับต้นพญาวานร ที่ความเข้มข้น 5.3 และ 3.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเป็นพิษต่อเซลล์ human epidermoid carcinoma ของช่องจมูก และ P388 lymphocytic leukemia cells ในหลอดทดลองตามลำดับ โดยมีสาร andrographolide เป็นสารออกฤทธิ์ในขนาด 1.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ส่วนสาร 14-deoxy-11,12-didehydroandrographolide และ neoandrographolide ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าว

ในการทดลองที่ใช้สารสกัดจากเฮกเซนของพญาวานร และใช้เซลล์ไลน์ P388 มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.31 และ 2.17 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Siripong และคณะ (1997) ที่ได้ทำการการทดสอบสารสกัดของทองพันชั่ง (*Rhinacanthus nasutus* Linn.) กับเซลล์ lymphocytic leukemia (P388) โดยใช้สารสกัดเฮกเซนจากรากทองพันชั่ง ในการทดลอง พบว่าสารที่ก่อความเป็นพิษเป็นอนุพันธ์ของ naphthoquinone มี 3 ชนิด คือ epoxyrhinacanthin B, epoxy- rhinacanthin C, rhinacanthin C โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.62 1.42 และ 3.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรรณี (2548) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดด้วยน้ำและเอธิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ของสมุนไพรไทย 27 ชนิดต่อ Vero cell ที่ได้จากเซลล์ไตของลิงพันธุ์ African green monkey (*Cercopithecus aethiops*) พบว่าสมุนไพรชนิดที่อยู่ในวงศ์เดียวกับพญาวานรได้แก่ สารสกัดด้วยเอธิล-แอลกอฮอล์ของต้นและใบฟ้าทะลายโจร (*Andrographis paniculata* Wall.) มีค่าความเป็นพิษต่อเซลล์สูงโดยมีค่า 50 เปอร์เซ็นต์ cytotoxic dose (CD_{50}) เท่ากับ 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ของ ใบเสลดพังพอนตัวผู้ (*Barleria lupulina* Lindl.) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีค่า CD_{50} มากกว่า 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดลองขั้นตอนในการสกัดสารจากพญาวานรนั้นจะใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ 3 ชนิด (เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล) ในการสกัดสารออกมาด้วยวิธีการหมัก ซึ่งตรงกับวิธีการทดลองของ นภัสวรรณ์ และคณะ (2546) ที่ได้นำใบกระเบากลัก (*Hydnocarpus ilicifolia*) มาสกัดด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด คือเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล โดยทำการสกัดด้วยวิธีการหมัก แล้วนำสารสกัดไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช 2 ชนิด ได้แก่ *Fusarium oxysporum* และ *Xanthomonas campestris* โดยวิธี disc diffusion พบว่าสารสกัดจากเอทานอลสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืชทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าสารสกัดเฮกเซน และไดคลอโรมีเทน

Kintanar และ Mercado-Sison (1978) รายงานว่าการฉีดสารสกัดซาโปนินของฟ้าทะลายโจรเข้าช่องท้องของหนูถีบจักรในขนาด 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้สัตว์ทดลองเพลีย หายใจเร็ว กล้ามเนื้ออ่อนแรง และมีการเปลี่ยนอิริยาบถลดลง ในขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หลังจากฉีดได้ 8 นาที มีอาการชัก สั่นและตาย ส่วนสารสกัดน้ำของฟ้าทะลายโจรในขนาด 300 มิลลิกรัม ทำให้สัตว์ทดลองเพลียมีอาการอ่อนเพลีย การหายใจเร็ว การรับรู้ลดลงและกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการคงอยู่ 24 ชั่วโมง ในขนาด 1,000 มิลลิกรัม มีอาการกล้ายๆ กับขนาด 300 มิลลิกรัม แต่ตายใน 24 ชั่วโมง สารสกัดอีเทอร์ของฟ้าทะลายโจร 100 มิลลิกรัม ทำให้การรับรู้ และระบบการเคลื่อนไหวลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาการคงอยู่ 1 ชั่วโมง ส่วนในขนาด 1,000 มิลลิกรัม อาการเหมือนกันแต่ตายใน 45 นาที สารสกัดอีเทอร์จากฟ้าทะลายโจรในขนาด 300 มิลลิกรัม ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย การเคลื่อนไหวและกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการจะคงอยู่ 2 ชั่วโมงเมื่อให้ขนาด 1,000 มิลลิกรัม อาการอ่อนแรงและตายหลัง 24 ชั่วโมง สารสกัดแอลกอฮอล์ของฟ้าทะลายโจรขนาด 300 มิลลิกรัม ทำให้มีอาการอ่อนเพลีย การเคลื่อนไหวลดลง กล้ามเนื้ออ่อนแรง และอาการคงอยู่ 24 ชั่วโมง ขนาด 1,000 มิลลิกรัม ในเวลา 5 ชั่วโมง 5 นาที หลังฉีด หนูจะมีอาการสั่นในที่สุดตาย ส่วนสารสกัดอีเทอร์ของฟ้าทะลายโจรที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ส่วนหนึ่งในขนาด 1000 มิลลิกรัม จะทำให้อ่อนเพลีย และตายใน 3 ชั่วโมง 30 นาทีหลังได้ยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ DMSO เป็นตัวละลายผลึกฟอร์มาซานยังสอดคล้องกับการศึกษาของเบญจมาศ และคณะ (2546) ที่ทำการศึกษาการพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี MTT โดยใช้เซลล์ที่ถูกเตรียมจากม้ามของหนูเมาส์เพศเมียในการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการละลายผลึกฟอร์มาซานระหว่าง DMSO และ Isopropanol พบว่า DMSO เป็นสารละลายอินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายผลึกฟอร์มาซานได้ดีกว่า Isopropanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ L929 และ P388 ในหลอดทดลอง ซึ่งทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT โดยเซลล์ไลน์ L929 และ P388 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่สารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานรที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.375, 0.75, 1.5 และ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษจากสารสกัดจากพญาวานรด้วยวิธี MTT โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย MTT เท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ DMSO:ethanol ในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลายผลึกฟอร์มาซาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยง เซลล์ไลน์ L929 และ P388 ในสารสกัดจากพญาวานรที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อนำมาคำนวณหาร้อยละของเซลล์มีชีวิตพบว่าทั้งเซลล์ไลน์ L929 และ P388 มีร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่สอดคล้องกัน นั้นคือค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่ 24 ชั่วโมงของทั้งสองเซลล์ จะมีค่ามากกว่าค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตที่ 48 ชั่วโมง แสดงว่าเวลามีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ เช่นเดียวกับค่า CC_{50} ที่คำนวณได้ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ของเซลล์ไลน์ L929 และ P388 มีค่า CC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงมากกว่า 48 ชั่วโมง ซึ่งหมายความว่าถ้าต้องการให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมงจะต้องใช้ความเข้มข้นของสารสกัดจากพญาวานรมากกว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดพญาวานรจากตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด (เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล) เมื่อพิจารณาจากค่า CC_{50} พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดพญาวานรจากไดคลอโรมีเทนมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ L929 มากที่สุด เพราะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุดในการทำให้เซลล์ตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสารสกัดจากเฮกเซน และเอทานอลตามลำดับ ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมงสารสกัดพญาวานรจากเฮกเซนมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ L929 มากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดจากไดคลอโรมีเทน และเอทานอลตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารสกัดพญาวานรจากตัวทำละลายอินทรีย์ทั้ง 3 ชนิด (เฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอล) เมื่อพิจารณาจากค่า CC_{50} พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง สารสกัดพญาวานรจากเฮกเซนมีผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด เพราะใช้ความเข้มข้นของสารสกัดน้อยที่สุดในการทำให้เซลล์ตายเป็นจำนวน 50 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาเป็นสารสกัดจากไดคลอโรมีเทนและเอทานอลตามลำดับ ส่วนที่เวลา 48 ชั่วโมงสารสกัดพญาวานรจากเฮกเซนมีผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ P388 มากที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดจากเอทานอล และไดคลอโรมีเทน ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1) ในการทดสอบสารสกัดจากพญาวานรที่ตัวทำละลายทั้ง 3 ชนิดนั้น สารสกัดที่ใช้ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมโครเมตร ซึ่งอาจทำให้สารบางตัวที่มีอยู่ในพญาวานรไม่สามารถผ่านได้

2) ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานร ควรทำการทดลองเพิ่มจำนวนซ้ำ เพื่อให้ผลทดลองมีความถูกต้องแม่นยำขึ้น

3) ควรมีการทดสอบกับเซลล์ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรในเซลล์

4) ควรมีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากพญาวานรด้วยวิธีการทดสอบอื่นๆ และหาสารตัวยาที่มีความสำคัญในพญาวานร เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำของผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์ และนวลอนงค์ จิระกาญจนากิจ. 2550. ความรู้พื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์

คณิสส์ เสงี่ยมสุนท, นงนุช กำลังแพทย์ และ เรณู เวชรัชต์พิมล. 2548. ความเป็นพิษของสารสะเดาสกัดที่มีผลต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เพาะเลี้ยงของหนู(L929). โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศิลปากร

นภัสวรรณ์ และจันทร์เพ็ญ. 2549. การสกัดสารจากใบกระเบากลัก เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคพืช *Fusarium oxysporum* และ *Xanthomonas campestris*. โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา

เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์. 2546. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน. สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ผ่องพรรณ ศิริพงษ์, บุญส่ง คงคาทิพย์, ขวัญใจ กนกเมธากุล, ยูกิโอะ ฮิโตซึยานากิ, โคอิชิ ทาเกยา และ ฮิเดจิ อิโทกาวา. 2549. ศักยภาพการต้านเซลล์มะเร็งของสมุนไพรเหงือกปลาหมอ. สถาบันมะเร็งแห่งชาติ และ ภาควิชาเคมี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รัตนา อินทรานุปกรณ์. 2547. การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วรรณี ชิวปรีชา และ มาลี ศรีสดสุข. 2548. พิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากสมุนไพรไทยต่อเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร กำแพงแสน และ สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

Kintanar, Q.L. and Mercado-Sison, F.E. 1978. Pharmacological screening of Philippine plants using a multidimensional observation technique in mice. *The Philippine J Sci.*107(1-2) :71-94.

Phillip, J.W., David, K.O., Todd C.T., and Peter L.G. 1990. Differences in myristic acid synthesis and in metabolic rate for P388 cells resistant to doxorubicin. *Journal of Lipid Research* 31 :173-182

Otake, T., Mori, H. and Morimoto, M. 1995. Screening of Indonesian plant extracts for anti-human immunodeficiency virus- type 1 (HIV-1) activity. *Phytother Res* .9(1) :6-10.

Ryan, J.A. 2003. Introduction to Animal Cell Culture. Life Science. Corning Incorporated. USA, 1-8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Shamsuzzoha, M., Shamsur Rahman, M. and Mohiuddin Ahmed, M. 1978. Antifertility effect in mice of medicinal plant of family Acanthaceae. *Lanc t* :900.

Shamsuzzoha, M., Shamsur Rahman, M. and Muhiuddin Ahmed, M. 1979. Antifertility activity of a medicinal plant of the genus Andrographis Wall (Family Acanthaceae). *Bangladesh Med Res Counc Bull.* 5(1):14-8.

Siripong, P., Ohta, T., Kongkathip, B., Kongkathip, N., Picha, P., Phromdej, C. and Nozoe S. 1997. Two new cytotoxic naphthoquinone derivatives from *Rhinacanthus nasutus* Kurz. *Abst Inter Union Pure Applied Chemistry (IUPAC) Conf Phuket.* 23-27 November :137.

Siripong, P., Kongkathip, B. and Preechanukool, K. 1997b. Cytotoxic diterpenoid constituents from *Andrographis paniculata* Nees leaves. *Sci Soc Thailand* .18:187-94.

Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu, P.L., Teng, C.H. and Wu, Y.C. 1988. Isolation and cytotoxicity of rhinacanthin-A and - B, Two napthoquinones from *Rhinacanthus nasutus*. *Phytochemistry.* 27 (12) : 3787-3788.

Wu, T.S., Hsu, H.C., Wu, P.L., Teng, C.H. and Wu Y.C. 1998b. Rhinacanthin-Q, a naphthoquinone from *Rhinacanthus nasutus* and its biological activity. *Phytochemistry* .49 (7) : 2001-2003.

[Online].Available: http://aqua.ait.ac.th

[Online].Available: http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth

[Online].Available: http://roiet.doae.go.th/mueang

[Online].Available: http://hoanngoc.th.com.

[Online].Available: http://samunpai.com/xchange/index.php

[Online].Available: http://dsmz.de/mutzoo2.html

[Online].Available: http://hyclone.com/news/rsm.html

[Online].Available: http://esf.edu/efb/schulz/Limnology/growthcurve.JPG

[Online].Available: http://eoffice.wu.ac.th

[Online].Available: http://ecoserve.net

[Online].Available: http://aicstanford.edu

[Online].Available: http://epa.gov/nerlcwww/chap9.pdf

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียม PBS (1X)

ปริมาตรที่เตรียม 1000 มิลลิลิตร

NaCl	8 กรัม
KCl	0.2 กรัม
KH_2HPO_2	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	2.9 กรัม
น้ำกลั่น	

1) นำ NaCl, KCl, KH_2HPO_2 และ Na_2HPO_4 ใส่ในบีกเกอร์และเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
2) ใช้แท่งแก้วคนสารเคมีทั้งหมดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3) ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรในกระบอกตวงโดยใช้น้ำกลั่น
4) ใส่ขวดดูแรนขนาด 1000 มิลลิลิตร และเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียม EDTA

ปริมาตรที่เตรียม 200 มิลลิลิตร

EDTA	40 มิลลิกรัม
PBS	200 มิลลิกรัม

1. ชั่ง EDTA 40 มิลลิกรัมใส่ลงในบีกเกอร์
2. เติม PBS 150 มิลลิลิตรแล้วใช้แท่งแก้วคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับปริมาตรโดยใช้ PBS ให้เป็น 200 มิลลิลิตรในกระบอกตวง
4. ใส่ขวดดูแรนและเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมเอนไซม์ทริปซิน 0.25 เปอร์เซ็นต์

1. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน stock เอนไซม์ทริปซินผงความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะได้ เอนไซม์ทริปซินที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

2. ดูดเอนไซม์ทริปซินที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ EDTA ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดดูแรน และทำการฆ่าเชื้อโดยใช้การกรองผ่าน membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จะได้เอนไซม์ทริปซิน 0.25 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ L929

ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร

1. ผสมอาหาร DMEM กับ FBS ในอัตราส่วน 9:1 คือ DMEM 90 มิลลิลิตร กับ FBS 10 มิลลิลิตร

2. ทำการกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตรและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. เติม Gentamycin 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร

5. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์ P388

ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร

4. ผสมอาหาร RPMI 1640 กับ FBS ในอัตราส่วน 9:1 คือ RPMI 1640 90 มิลลิลิตร กับ FBS 10 มิลลิลิตร

5. ทำการกรองด้วย membrane filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตรและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. เติม Gentamycin 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร

6. การเตรียม freezing media

ปริมาตรที่เตรียม 10 มิลลิลิตร

1. เตรียม DMEM หรือ RPMI 1640 : FBS : DMSO ในอัตราส่วน 7:2:1 จะได้ freezing media 10 มิลลิลิตร

2. ทำการกรองด้วย millipore filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตรที่เตรียม 20 มิลลิลิตร

1. ชั่งผง MTT ผงจำนวน 60 มิลลิกรัม ลงในขวดสีชา

2. ละลายผง MTT ด้วย PBS 20 มิลลิลิตร นำไป vortex เพื่อให้ผง MTT ละลายจนหมด จะได้สารละลาย MTT ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

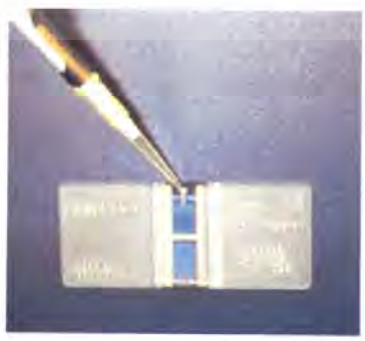
6. การเตรียม Trypan blue สำหรับใช้นับเซลล์ (http://www.epa.gov/nerlcwww/chap9.pdf)

1. ใส่ทริพแพนบลูผง 0.5 กรัม ในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร
2. ใส่น้ำที่ปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร
3. เขย่าจนทริพแพนบลูละลายหมด
4. การทำให้ปลอดเชื้อ ด้วยการกรองด้วย millipore filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

7. วิธีการนับเซลล์และการคำนวณเซลล์

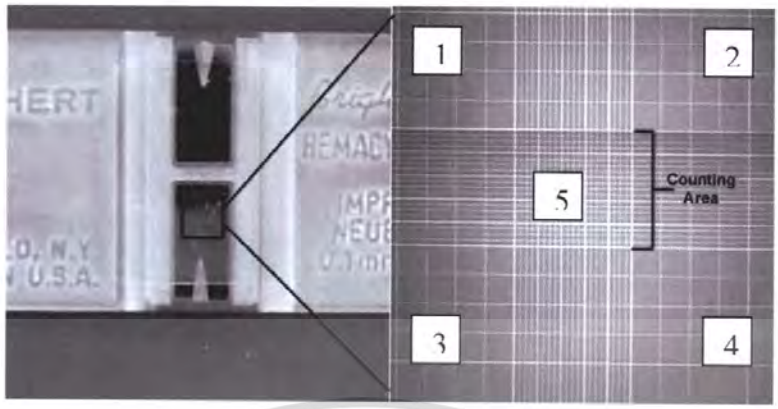
1. เตรียมเซลล์ที่ต้องการนับจำนวน กรณีที่เป็นเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ต้องทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเสียก่อน แต่ถ้าเป็นเซลล์แบบแขวนลอยสามารถดูดเซลล์ไปวัดได้เลย
2. ดูดเซลล์แขวนลอย 40 ไมโครลิตร และทำการย้อมสีด้วยทริปแพนบลู 10 ไมโครลิตร
3. ทำความสะอาด coverslip และวางลงบน hemacytometer
4. ดูดเซลล์แขวนลอยที่ย้อมสีปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในช่องทั้งสองด้านของ hemacytometer ดังรูปที่ ก-1
5. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X หรือ 40X โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีของทริปแพนบลู ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีฟ้าหรือน้ำเงินของทริปแพนบลู
6. นับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องใหญ่ดังรูปที่ ก-2 (ช่องตรงหมายเลข 1-5) และบันทึกจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย
7. ทำการคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรต่อไปนี้

จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย X 10^4 X ค่าความเจือจาง (dilution factor)



รูปที่ ก-1 บริเวณที่ใส่เซลล์ลงไปใน hemacytometer (www.aqua.ait.ac.th)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ก-2 การนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer แบบ 5 ช่องใหญ่ (www.aqua.ait.ac.th)

ตัวอย่างการคำนวณเซลล์ที่ต้องการเตรียม ที่ค่าการเจือจาง 5/4

เซลล์ที่ไม่ติดสีทริปแพนบลู ต่อ 1 ช่องใหญ่ (primary sguare)

Grid A 28 35 25 32 44 = 164 เซลล์

Grid B 30 32 26 40 29 = 157 เซลล์

รวม = 321 เซลล์

เฉลี่ย = 32.1 เซลล์

จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร = $32.1 \times 10^4 \times 5/4 = 6.42 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

8. การเตรียมเซลล์ให้ได้ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.นับเซลล์และคำนวณเซลล์ที่ได้ (สมมุติ ได้เซลล์เท่ากับ 6.42×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

2.ต้องการเตรียมเซลล์ให้ได้ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร 10 มิลลิลิตร

จากสูตร $N_1V_1 = N_2V_2$

$6.42 \times 10^5 (X) = (1x10^5)(10)$

$X = 1.558$ มิลลิลิตร

3. ดังนั้นดูดเซลล์ในฟลาสก์มา 1.558 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเพาะเลี้ยงจำนวน 8.442 มิลลิลิตร จะได้เซลล์ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร 10 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. สูตรการคำนวณหาค่าจำนวนเซลล์ที่เพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Population doubling time, PDT)

$$\text{Population doubling time (PDT)} = \frac{(t - t_0)\log 2}{(\log N - \log N_0)}$$

t_0 หมายถึง เวลาเริ่มต้นที่นับเซลล์หรือปลูกเซลล์ (ชั่วโมง หรือวัน)

t หมายถึง เวลาที่เก็บเกี่ยวเซลล์ ช่วงที่เซลล์มีการเจริญสูงสุด (ชั่วโมง หรือวัน)

N_0 หมายถึง จำนวนเซลล์ที่ปลูก (ต่อมิลลิลิตร) ณ เวลา t_0

N หมายถึง จำนวนเซลล์ที่เก็บเกี่ยว (ต่อมิลลิลิตร) ณ เวลา t

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MTT

ตาราง ข-1 การทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานรในเซลล์ไลน์ L929 ที่ 24 ชั่วโมง

กำหนดให้ตัวอักษร

- H คือ สารสกัดเฮกเซนจากพญาวานร
- D คือ สารสกัดไดคลอโรมีเทนจากพญาวานร
- E คือ สารสกัดเอทานอลจากพญาวานร

ความเข้มข้น (mg/ml)	H 3	H 1.5	H 0.75	H 0.375	D 3	D 1.5	D 0.75	D 0.375	E 3	E 1.5	E 0.75	E 0.375
ซ้ำที่ 1	0.066	0.218	0.337	0.330	0.065	0.164	0.279	0.328	0.065	0.327	0.386	0.39
ซ้ำที่ 2	0.066	0.242	0.420	0.398	0.065	0.149	0.287	0.316	0.065	0.346	0.35	0.41
ซ้ำที่ 3	0.070	0.218	0.354	0.350	0.067	0.168	0.303	0.358	0.067	0.382	0.34	0.38
ซ้ำที่ 4	0.065	0.242	0.322	0.383	0.066	0.136	0.308	0.375	0.064	0.319	0.36	0.39
ซ้ำที่ 5	0.068	0.277	0.366	0.384	0.065	0.156	0.292	0.331	0.080	0.363	0.366	0.42
ซ้ำที่ 6	0.070	0.239	0.319	0.360	0.072	0.160	0.287	0.359	0.078	0.353	0.364	0.43
Control	0.278	0.280	0.272	0.280	0.258	0.268	0.230	0.228	0.259	0.25	0.236	0.259
Blank	0.081	0.066	0.060	0.061	0.063	0.062	0.065	0.061	0.070	0.063	0.059	0.064

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-2 ทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานรในเซลล์ไลน์ L929 ที่ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (mg/ml)	H 3	H 1.5	H 0.75	H 0.375	D 3	D 1.5	D 0.75	D 0.375	E 3	E 1.5	E 0.75	E 0.375
ซ้ำที่ 1	0.068	0.211	0.418	0.551	0.070	0.181	0.295	0.513	0.067	0.406	0.462	0.486
ซ้ำที่ 2	0.069	0.246	0.463	0.565	0.075	0.187	0.424	0.522	0.064	0.436	0.491	0.495
ซ้ำที่ 3	0.076	0.220	0.452	0.505	0.076	0.204	0.451	0.627	0.066	0.412	0.459	0.510
ซ้ำที่ 4	0.074	0.215	0.408	0.531	0.071	0.211	0.524	0.602	0.065	0.446	0.418	0.446
ซ้ำที่ 5	0.071	0.235	0.404	0.516	0.073	0.216	0.472	0.596	0.064	0.461	0.401	0.533
ซ้ำที่ 6	0.072	0.28	0.421	0.536	0.076	0.259	0.525	0.590	0.064	0.403	0.439	0.357
Control	0.555	0.696	0.579	0.557	0.743	0.640	0.542	0.522	0.465	0.514	0.435	0.531
Blank	0.069	0.069	0.062	0.063	0.061	0.065	0.064	0.062	0.061	0.063	0.066	0.063

ตาราง ข-3 ทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานรในเซลล์ไลน์ P388 ที่ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (mg/ml)	H 3	H 1.5	H 0.75	H 0.375	D 3	D 1.5	D 0.75	D 0.375	E 3	E 1.5	E 0.75	E 0.375
ซ้ำที่ 1	0.576	0.690	0.953	1.101	0.632	0.965	1.050	1.172	0.645	1.122	1.125	1.356
ซ้ำที่ 2	0.548	0.664	1.174	1.185	0.639	1.109	1.133	1.196	0.593	1.088	1.181	1.350
ซ้ำที่ 3	0.530	0.653	1.038	1.103	0.619	0.939	1.088	1.185	0.745	1.110	1.117	1.373
ซ้ำที่ 4	0.545	0.734	1.063	1.090	0.678	0.946	1.134	1.204	0.749	0.921	1.279	1.311
ซ้ำที่ 5	0.580	0.709	1.145	1.174	0.645	0.866	1.053	1.155	0.673	1.086	1.121	1.242
ซ้ำที่ 6	0.525	0.700	1.120	1.054	0.610	0.912	1.043	1.230	0.785	0.983	1.247	1.296
Control	1.073	1.192	1.131	1.258	1.222	1.227	1.151	1.144	1.041	1.086	1.191	1.118
Blank	0.192	0.191	0.181	0.181	0.187	0.183	0.196	0.191	0.204	0.220	0.214	0.188

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ข-4 ทดสอบด้วยสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานรในเซลล์ไลน์ P388 ที่ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (mg/ml)	H 3	H 1.5	H 0.75	H 0.375	D 3	D 1.5	D 0.75	D 0.375	E 3	E 1.5	E 0.75	E 0.375
ซ้ำที่ 1	0.399	0.796	0.895	0.884	0.561	0.698	0.717	0.822	0.579	0.6	0.777	1.126
ซ้ำที่ 2	0.414	0.817	0.758	0.949	0.541	0.673	0.766	0.881	0.551	0.651	0.731	1.326
ซ้ำที่ 3	0.419	0.801	0.82	0.806	0.591	0.71	0.815	0.874	0.583	0.678	0.702	1.289
ซ้ำที่ 4	0.435	0.777	0.805	0.889	0.578	0.73	0.814	0.912	0.615	0.614	0.778	0.934
ซ้ำที่ 5	0.414	0.703	0.846	0.856	0.556	0.779	0.787	0.914	0.587	0.65	0.768	1.058
ซ้ำที่ 6	0.416	0.725	0.818	0.843	0.525	0.634	0.784	0.891	0.662	0.684	0.777	0.966
Control	0.969	1.011	0.785	0.717	0.605	0.735	0.783	0.624	0.618	0.751	0.84	1.073
Blank	0.226	0.199	0.921	0.988	0.893	0.962	0.937	1.01	1.058	0.974	0.84	0.201

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตาราง ค-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แหล่งของความแปรผัน	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
ชนิดของสารสกัด	19517.139	2	9758.570	104.220	.000
ความเข้มข้นต่างๆ	308989.361	4	77247.340	824.993	.000
ชนิดของสารสกัด * ความเข้มข้นต่างๆ	23614.981	8	2951.873	31.526	.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	7022.545	75	93.634		
รวม	1361448.971	90			

ตาราง ค-2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แหล่งของความแปรผัน	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ชนิดของสารสกัด	676.523	2	338.261	5.574	.006
ความเข้มข้นต่างๆ	133815.130	4	33453.782	551.259	.000
ชนิดของสารสกัด * ความเข้มข้นต่างๆ	9834.527	8	1229.316	20.257	.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	4551.457	75	60.686		
รวม	574211.888	90			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค-3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ P388 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

แหล่งของความแปรผัน	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ชนิดของสารสกัด	4545.907	2	2272.953	74.244	.000
ความเข้มข้นต่างๆ	45943.353	4	11485.838	375.176	.000
ชนิดของสารสกัด * ความเข้มข้นต่างๆ	2973.742	8	371.718	12.142	.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	2296.093	75	30.615		
รวม	726304.941	90			

ตาราง ค-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ไลน์ L929 ที่มีชีวิตเมื่อเพาะเลี้ยงในสารสกัดเฮกเซน ไดคลอโรมีเทน และเอทานอลจากพญาวานร ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

แหล่งของความแปรผัน	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ชนิดของสารสกัด	638.276	2	319.138	6.531	.002
ความเข้มข้นต่างๆ	42687.219	4	10671.805	218.396	.000
ชนิดของสารสกัด * ความเข้มข้นต่างๆ	6265.429	8	783.179	16.028	.000
ความคลาดเคลื่อนจากการทดลอง	3664.831	75	48.864		
รวม	579433.594	90			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้